

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Psiquiatría



## **TESIS DOCTORAL**

**Título**

**Diseño y evaluación de un modelo experimental para  
esclerosis lateral amiotrófica esporádica mediante el efecto  
citotóxico del líquido cefalorraquídeo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Cristina Valencia Sánchez**

**Directores**

**Jorge Matías-Guiu Guía  
Rocío García-Ramos García**

**Madrid, 2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID



## **Tesis Doctoral**

**Diseño y evaluación de un modelo experimental para  
esclerosis lateral amiotrófica esporádica mediante el  
efecto citotóxico del líquido cefalorraquídeo**

**Realizada por** Cristina Valencia Sánchez

**Dirigida por** Jorge Matías-Guiu Guía

Rocío García-Ramos García

Departamento de Medicina de la UCM

**Programa de doctorado en Neurociencias**

**Departamento de Psiquiatría**



*A mi familia*



## **AGRADECIMIENTOS**



Me gustaría expresar mi profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de este proyecto:

A Jorge Matías Guiu, por incorporarme al mundo de la investigación, por darme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección y poder contar siempre con su inestimable consejo y experiencia.

A Rocío García Ramos, por el tiempo dedicado, por sus valiosas sugerencias y su apoyo.

A Ulises Gómez, por su trabajo y dedicación, sin el que no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto, y por su paciencia y el tiempo dedicado a resolver mis dudas y enseñarme.

A Lucía Galán, por estar siempre dispuesta a brindarme su ayuda y consejo, por su motivación y su confianza.

A Juan Antonio Barcia, Juan Raúl Brin, Álvaro Vela, Antonio Guerrero, Matilde Yañez, Antonio García, José Manuel García Verdugo, Teresa Guillamón y Montserrat González, por su colaboración fundamental en diferentes aspectos del trabajo y por su apoyo científico, todos ellos claves para la realización de este proyecto.

A M<sup>a</sup> Soledad Benito, Pablo González y M<sup>a</sup>Cruz Rodríguez por su ayuda imprescindible y a mis compañeros Sara García y Christian Sánchez por su colaboración en las fases iniciales del trabajo.

A los pacientes, que colaboran de forma desinteresada en la investigación.

También quiero expresar mi reconocimiento y gratitud a mis compañeros y maestros del Servicio de Neurología, de los que aprendo día a día, por la motivación que supone la dedicación y la ilusión que ponen en el desempeño de su trabajo.

Finalmente, a mi familia y amigos, por su apoyo constante y por la comprensión y ánimo recibidos.

Este proyecto además ha sido posible gracias a que ha sido en parte financiado por una beca concedida por la Fundación Mutua Madrileña a Jorge Matías Guiu.





# ÍNDICE



**LISTA DE ABREVIATURAS.....IX**

**I. INTRODUCCIÓN ..... 1**

**1. LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA..... 3**

**2. NEUROPATOLOGÍA EN ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA ..... 5**

2.1 ELA esporádica (SALS) ..... 5

2.2 ELA familiar (FALS) ..... 7

2.3 Hallazgos recientes en las inclusiones: TDP43 y FUS ..... 8

**3. MODELOS EXPERIMENTALES DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA..... 12**

3.1 Modelo “*wobbler mouse*” ..... 12

3.2 Modelo SOD1 ..... 13

- *Hallazgos neuropatológicos en el modelo SOD1* ..... 14

- *Hipótesis patogénicas basadas en el modelo SOD1* ..... 16

- *Ensayos terapéuticos en modelo SOD1* ..... 20

- *Diferencias neuropatológicas con ELA esporádica*..... 21

3.3 Modelo TDP43 ..... 22

3.4 Modelo FUS ..... 24

3.5. Modelos basados en otras formas poco frecuentes de FALS ..... 25

## ÍNDICE

---

3.6. Otros modelos.....	26
3.7 Limitaciones de los modelos experimentales de ELA .....	27
<b>4. TOXICIDAD DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE LOS PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA .....</b>	<b>28</b>
4.1 Citotoxicidad del LCR-ELA <i>in vitro</i> .....	30
4.2 Citotoxicidad del LCR-ELA <i>in vivo</i> .....	38
4.3 Correlación clínica del efecto citotóxico .....	44
4.4 Estudio de potenciales terapias sobre la citotoxicidad de LCR-ELA....	45
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>1. OBTENCIÓN DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO .....</b>	<b>53</b>
1.1 LCR-ELA.....	53
1.2 LCR-Control.....	55
1.3 Conservación de las muestras.....	56
<b>2. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>56</b>
2.1 Animales.....	56
2.2 Grupos experimentales.....	57

## ÍNDICE

---

2.3 Administración de LCR .....	57
2.4 Cirugía para implantación de bomba osmótica de LCR.....	58
2.5 Variables clínicas exploradas.....	62
2.6 Variables neurofisiológicas .....	66
2.7 Sacrificio del animal .....	67
<b>3 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO .....</b>	<b>68</b>
3.1 Técnicas de inmunofluorescencia.....	68
3.2 Análisis y cuantificación de la inmunofluorescencia.....	72
<b>4 DETERMINACIÓN DE ZINC EN TEJIDO .....</b>	<b>73</b>
<b>5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>74</b>
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
<b>1. VARIABLES CLÍNICAS Y NEUROFISIOLÓGICAS .....</b>	<b>77</b>
<b>2. ESTUDIO NEUROPATOLÓGICO .....</b>	<b>79</b>
2.1 Activación microglial: expresión de IBA-1 y MHC-II .....	80
2.2 Respuesta astrocitaria: expresión de GFAP, GLT-1 y S100 $\beta$ .....	83
2.3 Expresión de caspasa 3.....	88
2.4 Expresión de AKT y AKT fosforilada .....	89
2.5 Expresión de periferina .....	91

## ÍNDICE

---

2.6	Expresión de Cistatina C y Transferrina.....	93
2.7	Expresión de Ubiquitina .....	93
2.8	Expresión de TDP43.....	94
2.9	Expresión de Metalotioneina.....	95
2.10	Determinación de Zinc en tejido.....	97
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>		<b>99</b>
1.	Las ratas sobrevivieron hasta el momento del sacrificio programado sin presentar alteraciones clínicas.....	101
2.	La infusión de LCR procedente de pacientes con ELA en ratas causa lesiones histológicas .....	102
3.	La activación microglial aparece precozmente a partir de los 20 días en el grupo tratado con LCR-ELA .....	104
4.	Existe una activación astrocitaria definida por una mayor expresión de GFAP, S100 $\beta$ y GLT-1 en el grupo tratado con LCR-ELA.....	108
5.	En las ratas tratadas con LCR-ELA la activación microglial es anterior a la activación astrocitaria.....	113
6.	Existe un aumento de expresión de caspasa 3 indicadora de apoptosis en el grupo tratado con LCR-ELA.....	114
7.	Observamos un incremento transitorio de marcadores anti-apoptóticos en el grupo tratado con LCR-ELA .....	117

## ÍNDICE

---

8. La expresión de periferina aumenta de forma transitoria en el grupo tratado con LCR-ELA .....	119
9. Se observa TDP43 en el citoplasma de las motoneuronas del grupo tratado LCR-ELA .....	121
10. El grupo tratado con LCR-ELA muestra un aumento de expresión de transferrina y cistatina C .....	122
11. La presencia aumentada de marcadores descritos en los cuerpos de Bunina en el grupo LCR-ELA recuerdan a la histología de SALS.....	123
12. Las alteraciones histológicas descritas en el grupo tratado con LCR-ELA comienzan a nivel de médula lumbar .....	125
13. En el grupo tratado con LCR-ELA se observa un aumento la expresión de proteínas de unión a Zinc así como del contenido de Zinc.....	126
14. Las lesiones histológicas que aparecen en ratas tras la administración prolongada intraventricular de LCR-ELA podría ser un modelo experimental de ELA esporádica .....	128
15. Cuestiones planteadas ante los hallazgos y limitaciones del estudio	130
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>135</b>
<b>VII. RESUMEN .....</b>	<b>139</b>
<b>VIII. SUMMARY .....</b>	<b>139</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>169</b>

**X. ANEXOS..... 189**

ANEXO I: El efecto citotóxico del LCR-ELA sobre cultivos de motoneuronas de rata causa apoptosis citoplasmática. .... 191

ANEXO II: Determinación de zinc en LCR de pacientes con ELA y controles ..... 192

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ALSFRS	Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Ast-HIs	Astrocyte hyaline inclusions
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
cc	Centímetros cúbicos
ChAT	Colinacetiltransferasa
cm	Centímetro
Cu	Cobre
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
dl	Decilitro
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DFT	Demencia frontotemporal
DFT-ELA	Demencia frontotemporal asociada a esclerosis lateral amiotrófica
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAAT2	Excitatory amino-acid transporter tipo 2
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
FALS	Familial amyotrophic lateral sclerosis
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FUS	Fused in sarcoma
g	Gramo
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLT-1	Glutamate Transporter tipo 1
GRP-78	78 kDa Glucose-regulated protein

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

IBA-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IGF-1	Insulin-like growth factor tipo 1
K	Potasio
Kg	Kilogramo
LBHIs	Lewy body-like hyaline inclusions
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LCR-ELA	Líquido cefalorraquídeo procedente de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica
LDH	Lactato deshidrogenasa
L-NAME	L-Nitroarginine Methyl Ester
M	Molar
µg	Microgramo
mg	Miligramo
mGlutR I	Receptor metabotrópico de glutamato del grupo I
MHC	Major histocompatibility complex
µl	Microlitro
ml	Mililitro
µm	Micrómetro
mm	Milímetro
MT	Metalotioneína
Na	Sodio
NF-L	Neurofilamentos, subunidad ligera
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanómetro

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

NMDA	N-Methyl-D-aspartate
NSC-34	Neuroblastoma spinal cord hybrid cells
PI3K	Fosfatidil-inositol- 3- kinasa
PBS	Phosphate Buffered Saline
RE	Retículo endoplásmico
RHIs	Round hyaline inclusions
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revoluciones por minuto
SALS	Sporadic amyotrophic lateral sclerosis
SLIs	Skein like inclusions
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Superóxido dismutasa tipo 1
SSF	Suero salino fisiológico
TARDBP/TDP43	Transactivation response DNA-binding protein
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
UBQ	Ubiquitina
UPR	Unfolded protein response
VAPB	Vessicle associated membrane protein B
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPS54	Vacuolar protein sorting 54
VSC 4.1	Ventral spinal cord cells
Zn	Zinc



# I. INTRODUCCIÓN



## 1. LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que causa una pérdida de la función motora progresiva, causada por lesión y muerte de las motoneuronas en corteza motora, tronco cerebral y médula.

La prevalencia actual es de 4 a 6 casos por 100.000 (Matías-Guiu, 2007), con una cierta predominancia de afectación a varones (ratio varón: mujer 1,5:1) (Wijesekera, 2009).

El 90% de los casos de ELA son esporádicos (SALS). Un 10% de son casos familiares (FALS), de ellos, un 20% están asociados a una mutación en el gen de la Cu/Zn superóxido dismutasa-1 (SOD1) situado en el cromosoma 21 (Rosen, 1993), de herencia generalmente autosómica dominante. Hasta la fecha se han comunicado más de 150 mutaciones en el gen SOD1 (Andersen, 2006). Desde la descripción de este primer gen, se han descrito al menos otros 10 genes adicionales ligados a FALS, entre ellos Alsina, VAPB (*vessicle associated membrane protein B*), dinactina, TDP43 (*transactivation response DNA-binding protein*), FUS (*fused in sarcoma*) etc. como comentaremos más adelante (Siddique, 2011).

La edad media de inicio de la enfermedad esporádica varía entre los 55 y 65 años, mientras que los casos familiares suelen iniciar la clínica de forma más temprana, alrededor de una década antes. Aproximadamente 2/3 tienen un inicio espinal y 1/3 comienzan con síntomas bulbares. El cuadro clínico se caracteriza por síntomas y signos de afectación de primera y segunda

## *Introducción*

motoneurona progresivos, siendo la supervivencia media de 2-3 años en los casos de inicio bulbar y de 3-5 años en los casos espinales (Wijesekera, 2009).

Clásicamente se consideraba que en la ELA se preservaban las funciones cognitivas, sin embargo muchos pacientes presentan un deterioro cognitivo leve con déficits ejecutivos sutiles y un 5% asocian una demencia frontotemporal (DFT). Los recientes hallazgos neuropatológicos sugieren que la ELA y la DFT podrían formar parte de un espectro clínico-patológico (Phukan, 2007).

Más de 140 años después de su descripción en 1869 por Jean Martin Charcot, el mecanismo de la neurodegeneración, con vulnerabilidad preferencial de las motoneuronas, todavía no es completamente entendido, y no existe tratamiento curativo de la enfermedad.

## **2. NEUROPATOLOGÍA EN ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

Las características principales de la patología de la ELA son la degeneración y pérdida de motoneuronas, con astrogliosis y la presencia de inclusiones en el citoplasma de las neuronas degenerativas.

La afectación de motoneurona superior se evidencia por una pérdida de células de Betz en la corteza motora, con pérdida de axones y degeneración del haz corticoespinal, además de una astrogliosis variable que afecta tanto a la sustancia gris como a la blanca.

La pérdida de motoneuronas inferiores se observa en el asta ventral de la médula espinal y el tronco del encéfalo, preservando relativamente los núcleos oculomotores y el núcleo de Onuf a nivel sacro. Las motoneuronas que quedan son atróficas y contienen inclusiones intraneuronales (Wijesekera, 2009).

Existen algunas diferencias neuropatológicas entre los casos esporádicos y familiares como se describe a continuación (Se esquematizan en Tabla 1).

### **2.1 ELA esporádica (SALS)**

En SALS, la degeneración del haz corticoespinal en las columnas anterior y lateral de la médula espinal es particularmente evidente, sobre todo en segmentos medulares bajos. Se observa pérdida de fibras miélicas junto con astrogliosis.

## *Introducción*

Además hay una pérdida de motoneuronas inferiores a lo largo del asta ventral de la médula espinal. El músculo esquelético presenta atrofia por denervación.

Las motoneuronas afectadas en SALS presentan dos tipos principales de inclusiones citoplasmáticas:

- **Cuerpos de Bunina:** Son inclusiones eosinófilas granulares de 1-3µm de diámetro presentes en citoplasma o dendritas de las motoneuronas (no en el axoplasma). Ultraestructuralmente están constituidas por material amorfo electrodensito rodeado por estructuras tubulares y vesiculares (Okamoto, 2008). Expresan cistatina C (Okamoto, 1993) y transferrina (Mizuno, 2006), y en menor medida periferina (Mizuno, 2011). Sin embargo, no suelen presentar inmunorreactividad para ubiquitina (Leigh, 1991).

No sólo se han observado cuerpos de Bunina en pacientes con SALS, sino también en FALS no asociada a SOD y en demencia frontotemporal con enfermedad de motoneurona (DFT-ELA) (Kato, 2008).

Se distribuyen principalmente en las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal y tronco del encéfalo, y raramente en las células de Betz, núcleos oculomotores o núcleo de Onuf. Su origen es desconocido, se especula que podrían originarse del retículo endoplásmico o del aparato de Golgi (Okamoto, 2008).

El hecho de que aparezcan tanto en neuronas degenerativas como en neuronas de aspecto normal hace sospechar que se trata de una

alteración inicial de las motoneuronas, representado quizá un metabolismo proteico alterado (Okamoto, 2008).

- **Inclusiones “Skein-like” (SLIs) y “round hyaline” (RHIs):** Son inclusiones citoplasmáticas filamentosas que se marcan con inmunohistoquímica para ubiquitina, y son negativas para SOD1. Ultraestructuralmente son agregados de filamentos anormales de 15-20nm de diámetro (Kato, 2008).

## **2.2 ELA familiar (FALS)**

Entre los casos de FALS existe un grupo histopatológicamente similar a SALS que corresponde a los casos no asociados a mutación de SOD1. En estos casos encontramos cuerpos de Bunina, SLIs y RHIs.

Los casos de **FALS asociados a SOD1** mutado presentan también con frecuencia afectación neuropatológica de la columna posterior medular, con degeneración de de la columna posterior, núcleo de Clarke y tracto espinocerebeloso posterior. En estos casos la degeneración de motoneuronas inferiores es mucho más intensa que la del tracto corticoespinal, a diferencia de SALS (Kato, 2008).

En cuanto a las inclusiones descritas en las autopsias de estos pacientes con FALS asociado a SOD1, se han encontrado en las motoneuronas del asta anterior medular inclusiones similares a los cuerpos de Lewy, **LBHIs** (*Lewy Body-like hyaline inclusions*), que muestran un núcleo eosinófilo con un halo claro. Además, en algunos pacientes con larga supervivencia, se observan inclusiones hialinas similares en los astrocitos (**Ast-**

**Hls)** Ultraestructuralmente están compuestas de material filamentososo (de 15-25 nm de diámetro) y granular, a veces rodeados por neurofilamentos normales, sin membrana limitante. Ambos tipos de inclusiones son inmunorreactivas para SOD1, así como para ubiquitina (Kato, 2008). Sin embargo, en estos pacientes, no se observan los cuerpos de Bunina típicos de SALS.

### **2.3 Hallazgos recientes en las inclusiones: TDP43 y FUS**

La ubiquitinación de proteínas mal plegadas que se agregan en el núcleo o citoplasma de las neuronas es una característica frecuente en diferentes enfermedades neurodegenerativas.

Las inclusiones ubiquitinizadas son un hallazgo común en la patología de la ELA y la DFT. Neumann et al identificaron la proteína TDP-43 (*Transactivation response -DNA binding protein*) como el principal componente de estas inclusiones ubiquitinizadas (SLIs, RHIs, LBHIs), de pacientes tanto con DFT como con ELA (Neumann, 2006).

Además se han descrito mutaciones del gen de TDP43, situado en el cromosoma 1, en casos familiares (la mayoría de herencia autosómico dominante) y esporádicos de ELA y de DFT. Aunque estas mutaciones son infrecuentes, los estudios sugieren que podrían estar ligadas a la patogenia de la ELA (Sreedharan, 2008; Wegorzewska, 2011).

La proteína TDP 43 es una ribonucleoproteína que puede unirse a DNA, RNA y proteínas; juega un papel en la regulación de la transcripción y *splicing*, procesamiento y transporte de RNA.

## *Introducción*

Se ha encontrado TDP43 ubiquitinizada, en inclusiones en el citoplasma de las motoneuronas afectadas en pacientes con SALS y DFT. Además se ha observado en células gliales. En las inclusiones TDP43 se encuentra hiperfosforilada de forma anormal y escindida en su fragmento carboxi-terminal.

Mientras que TDP-43 se localiza de forma normal en el núcleo, en las neuronas afectadas se observa inmunorreactividad para TDP-43 en el citoplasma, especialmente en las inclusiones ubiquitinizadas, pero también se observa una inmunorreactividad difusa. Se cree que la redistribución de TDP-43 de su localización normal en el núcleo, al citoplasma podría ser un evento temprano en la patogenia de la neurodegeneración y que continúa en marcha a lo largo de la progresión de la enfermedad. Cabe la posibilidad de que TDP43 pierda su función normal en el núcleo, o bien que tenga propiedades tóxicas en el citoplasma (Giordana, 2010).

Estas inclusiones con inmunorreactividad para TDP-43 son características de pacientes con SALS y FALS no asociada a SOD1 así como DFT-ELA, y sin embargo no se encuentran en los casos de FALS asociada a SOD1. Esto sugiere que TDP-43 estaría implicada en la patogénesis de la ELA y que el mecanismo de degeneración de motoneuronas en FALS asociada a SOD1 podría ser diferente y que por tanto TDP43 sea fundamental en el entendimiento de la patogenia de SALS (Mackenzie, 2007).

## Introducción

Recientemente se han descrito mutaciones del gen FUS (*fused in sarcoma*), situado en el cromosoma 16, siendo una causa rara de ELA familiar, generalmente con herencia autosómica dominante.

La proteína FUS, al igual que TDP43, es una proteína de unión a DNA y RNA, localizada principalmente en el núcleo, que está implicada en el metabolismo del RNA y en la regulación de la transcripción, aunque su función no es bien conocida.

Se han observado inclusiones de FUS en el citoplasma de las motoneuronas del asta anterior de pacientes con SALS y FALS no asociada a SOD1, que por el contrario no se encuentran en casos de FALS-SOD1, ni en los modelos transgénicos de SOD1. También se han encontrado estas inclusiones en células gliales. A diferencia de TDP43, sí que se observaba inmunorreactividad para FUS en el núcleo (además del citoplasma) en estos casos (Deng, 2010).

En el estudio de Deng y cols observaron además que las inclusiones de FUS eran también inmunorreactivas con anticuerpos para TDP43 y ubiquitina, sugiriendo un importante papel de estas proteínas en SALS y en FALS no asociada a SOD1 (Deng, 2010). Sin embargo, otros autores no han confirmado este hallazgo y de hecho observan que la inmunorreactividad para FUS y TDP43 son excluyentes, en pacientes con ELA con mutaciones en el gen FUS y en pacientes con DFT; por tanto especulan que formarían parte de vías patogénicas diferentes, aunque podrían interactuar (Mackenzie, 2010).

## Introducción

Se desconoce si que las inclusiones de ubiquitina, TDP43 y FUS encontradas en SALS y en FALS no asociadas a SOD podrían ser tóxicas por sí mismas para las motoneuronas o bien que la formación de inclusiones secuestre otras proteínas, pero se desconoce si existe otro mecanismo (Deng, 2010).

El descubrimiento de estas dos proteínas de unión a RNA ha abierto nuevas líneas de investigación en la patogénesis de la ELA, y también en la DFT. Las semejanzas estructurales y funcionales de estas proteínas implican que alteraciones en el procesamiento del RNA pueden ser piezas claves en el desarrollo de la enfermedad (Mackenzie, 2010).

Neuropatología	SALS FALS no SOD1	FALS-SOD1
Histología	Degeneración más evidente del haz corticoespinal , sobre todo en segmentos espinales inferiores	Predomina afectación motoneurona inferior También afectación de columna posterior medular
Inclusiones	- Cuerpos de Bunina - Inclusiones UBQ+: SLIs y RHIs TDP 43 + FUS +	- Inclusiones UBQ+: LBHIs y Ast-HIs SOD+

**Tabla 1:** Resumen de la neuropatología de ELA esporádica y ELA familiar.

### **3. MODELOS EXPERIMENTALES DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

Los datos neuropatológicos de ELA en humano del los que disponemos provienen de estudios de autopsias, por lo que son sólo fases terminales de la enfermedad, y desconocemos mecanismo preciso de la neurodegeneración.

Los modelos animales han resultado fundamentales a la hora de estudiar los mecanismos implicados en la degeneración neuronal, así como en el ensayo de posibles terapias. Sin embargo existen algunas características neuropatológicas diferentes entre el humano y el modelo animal (Kato, 2008).

#### **3.1 Modelo “*wobbler mouse*”**

Uno de los primeros modelos animales de degeneración de las neuronas del sistema motor surgió a partir de una mutación espontánea en el gen autosómico recesivo *VPS54* (*vacuolar protein sorting 54*) que codifica una subunidad de una proteína asociada al aparato de Golgi necesaria para la fusión de vesículas de transporte (Van den Bosch, 2011).

Este ratón muestra una degeneración de las motoneuronas del tronco del encéfalo y de la médula espinal, con una denervación progresiva del músculo esquelético. La clínica comienza en la cuarta semana con inestabilidad de la marcha y temblor cefálico, que progresa en las siguientes semanas con debilidad y atrofia que afecta principalmente a los músculos de la cabeza, cuello y extremidades anteriores, con menor afectación de las extremidades posteriores (Duchen, 1968).

Sin embargo, este modelo no desarrolla una típica enfermedad de motoneurona, y la degeneración de motoneuronas y el inicio de la astrogliosis en la médula espinal van precedidas de una neurodegeneración más extensa. Además el ratón también presenta alteración de la espermiogénesis (Van den Bosch, 2011).

### **3.2 Modelo SOD1**

El desarrollo de un modelo transgénico en ratón de ELA familiar basado en SOD1 mutada G93A (con una sustitución de glicina por alanina en posición 93) ha permitido un extensa área de investigación en la patogénesis de la ELA familiar (Gurney, 1994). En este modelo, el animal inicia la clínica de la enfermedad con temblor en una o varias extremidades a los 90 días, a los 100 días presenta paresia de miembros, comenzando por las extremidades posteriores, y se extiende a las anteriores hasta severa cuadriplejía, y muere a los 120 días. (Kato, 2008). Después de este primer modelo se han creado otros animales transgénicos con al menos 12 mutaciones diferentes de SOD1 (Turner, 2008).

SOD1 es una metaloenzima Cu/Zn implicada en eliminación de radicales libres, su función es convertir aniones superóxido en peróxido de hidrógeno. Parece que la enzima SOD1 mutante tiene propiedades tóxicas ya que ni el ratón knock-out para la enzima ni los ratones transgénicos que sobreexpresan SOD1 humana normal presentan la enfermedad (Rothstein, 2009).

- *Hallazgos neuropatológicos en el modelo SOD1*

Las principales características histopatológicas del modelo SOD1 son pérdida de motoneuronas con astrocitosis, presencia de inclusiones SOD1 positivas incluyendo LBHIs y Ast-HIs, y formación de vacuolas. Estas alteraciones se observan predominantemente en motoneuronas inferiores. Se ha descrito una correlación de las inclusiones SOD1 positivas con la progresión y severidad de la enfermedad. Algunos autores sugieren que estas inclusiones derivan de una disfunción del retículo endoplásmico (RE) (Kato, 2008).

En el modelo transgénico G93A a los 90 días la vacuolización en el citoplasma de las motoneuronas es evidente, en el soma, dendritas y axones. A los 100 días se observa una ligera disminución del número de motoneuronas, con abundantes vacuolas y algunas inclusiones. En estadios tempranos, las vacuolas derivan de cisternas dilatadas de RE, y a medida que la enfermedad progresa, aumenta el número de vacuolas derivadas de las mitocondrias (y disminuyen las de RE). A los 120 días se observa una severa pérdida de motoneuronas del asta anterior, con prominentes inclusiones, siendo menos evidentes las vacuolas. Esta secuencia lleva a la hipótesis de que la lesión neuronal se produce cuando la célula es incapaz de retener la proteína mutada en las vacuolas (Kato, 2008).

En los estadios finales de la enfermedad, se observan unas astas anteriores medulares atroficas con importante depleción de motoneuronas y presencia de inclusiones en las motoneuronas supervivientes. Además se observa una moderada degeneración de las columnas anterior y lateral y una leve afectación de la columna posterior medular (Dal Canto, 1994).

Son interesantes los hallazgos del modelo G93A en estadios presintomáticos, antes de la aparición de síntomas motores en el roedor, entre ellos, la fragmentación del aparato de Golgi (Mourelatos, 1996) y la detección de marcadores de estrés de RE (Atkin, 2008):

- **El aparato de Golgi** juega un papel en el transporte y procesamiento de numerosas proteínas. En las neuronas, está implicado en el flujo axoplásmico de proteínas. Se ha observado en autopsias de pacientes con ELA esporádica y familiar una fragmentación del aparato de Golgi en las motoneuronas del asta anterior y de la corteza motora. Esta alteración se encuentra en la mayoría de las motoneuronas que tienen inclusiones citoplasmáticas, por lo que se cree que pueda estar relacionado con ellas; pero además se encuentra en motoneuronas aparentemente preservadas (Fujita, 2005).

También se ha observado esta fragmentación del Golgi en el asta anterior medular de los ratones transgénicos SOD1, y es interesante el hecho de que se encuentra esta alteración antes de que el ratón presente signos clínicos de déficit motor, ya en el día 30 (Mourelatos, 1996). Estos argumentos apoyan que la fragmentación del Golgi podría ser un evento temprano en la neurodegeneración en ELA (Fujita, 2005).

- **El retículo endoplásmico (RE)** regula la síntesis proteica, el ensamblaje de las proteínas sintetizadas y mantiene la homeostasis del calcio. El estrés oxidativo, las proteínas mal plegadas, la alteración de la homeostasis del calcio etc. causan una disfunción del RE llevando al "estrés de RE". El RE tiene una serie de respuestas protectoras al

estrés, la respuesta primaria UPR (*unfolded protein response*) reconoce las proteínas aberrantes y se expresan proteínas que promueven su ensamblaje normal (chaperonas). Otras respuestas llevan a suprimir la traslación o bien a la degradación de estas proteínas mal plegadas en los proteasomas. Aunque es una respuesta inicialmente protectora, el estrés de RE muy severo o prolongado induce la apoptosis vía activación de caspasas (Vijayalakshmi, 2011).

Se ha descrito activación del sistema UPR en el modelo SOD1, asociada además con la formación de inclusiones, ya que la inhibición de chaperonas llevaba a un aumento del número de inclusiones. La activación del sistema UPR, e incluso las fases iniciales de la cascada de activación de apoptosis ocurren de forma precoz en el modelo SOD1 G93A, antes de la aparición de síntomas motores, en el día 60 (Atkin, 2008). También se ha comprobado una activación del sistema UPR y de los efectores de apoptosis en las motoneuronas supervivientes médula espinal de pacientes con SALS (Atkin, 2008).

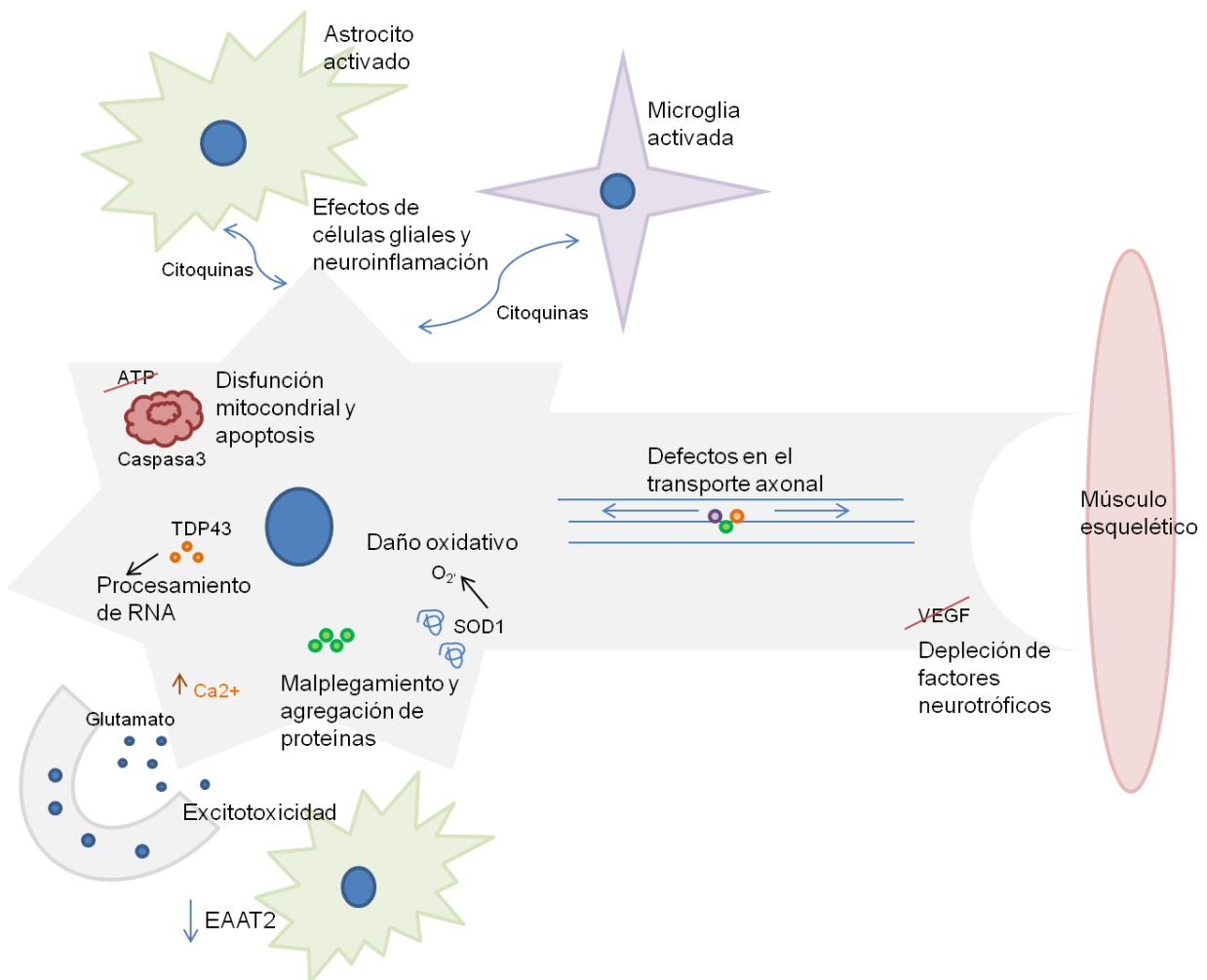
Esto sugiere que el estrés de RE forma parte de la patogénesis común de las diferentes formas de ELA, aunque se desconoce si es causa o consecuencia de otros desencadenantes primarios (Atkin, 2008).

- *Hipótesis patogénicas basadas en el modelo SOD1*

Los posibles mecanismos de toxicidad para las motoneuronas basados en los hallazgos en el modelo SOD1 incluyen el daño oxidativo, la acumulación de

## Introducción

agregados intracelulares, la disfunción mitocondrial, los defectos en el transporte axonal, deficiencia de factores de crecimiento, metabolismo aberrante del RNA, patología de las células gliales y excitotoxicidad por glutamato. Probablemente la convergencia de estas vías lleve al inicio de la enfermedad y su progresión (Rothstein, 2009). (Figura 1)



**Figura 1:** Mecanismos implicados en la patología de la ELA (Adaptado de Joyce, 2011).

La hipótesis del **daño oxidativo** se basa en que la mutación de SOD1 podría llevar a alterar su actividad con la formación de radicales libres de hidrógeno y activación de la cascada de daño oxidativo. Se han descrito diversos productos del metabolismo oxidativo elevados en los diferentes modelos SOD1, pero los resultados no son concluyentes (Rothstein, 2009).

De forma similar a otras enfermedades neurodegenerativas, la formación de **agregados intracelulares** se ha propuesto como mecanismo de toxicidad. De hecho, se observan inclusiones inmunorreactivas para SOD1 en FALS y en el modelo transgénico que se acumulan a medida que progresa la enfermedad. Esto puede llevar a la neurodegeneración mediante varios mecanismos, entre ellos secuestro de componentes celulares, alteración de la vía ubiquitina-proteasoma (Rothstein, 2009).

Las **alteraciones mitocondriales**, con vacuolización son evidentes desde los estadios iniciales en el modelo transgénico. Hay evidencias de que SOD1 mutada se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial (Turner, 2008). Se han propuesto como mecanismos de toxicidad alteración del metabolismo energético o de la homeostasis del calcio (Rothstein, 2009), además de la implicación de la maquinaria apoptótica mitocondrial con activación de caspasas (Turner, 2008).

En los modelos transgénicos se observan acúmulos de neurofilamentos aberrantes en el cuerpo celular y axón proximal. Los defectos en el **transporte axonal** causarían una alteración en el transporte de mitocondrias al axón así como de los factores neurotróficos periféricos (Rothstein 2009).

La sobreexpresión o administración de **factores neurotróficos** como VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) enlentecían la progresión de la enfermedad en los modelos transgénicos SOD1 (Rothstein 2009).

En el modelo transgénico SOD1 (y también en pacientes con ELA) se ha observado una reducción de los niveles del transportador EAAT2 (*excitatory amino-acid transporter*) de los astrocitos, encargado de la recaptación de glutamato de la hendidura sináptica. Esto causaría un aumento de los niveles de glutamato extracelular, con el consiguiente mecanismo de **excitotoxicidad**. (Rothstein 2009) La sobreexpresión de EAAT2 en el modelo transgénico SOD1 mejora el déficit motor y retrasa la pérdida de motoneuronas, aunque no retrasa el momento de inicio de la parálisis ni aumenta la supervivencia del modelo (Guo, 2003). Por otro lado, la manipulación del transportador para reducir su expresión en el modelo transgénico acelera el déficit motor una vez iniciada la enfermedad e incrementa la pérdida neuronal (Pardo, 2006). Estos resultados van a favor de un papel secundario de EAAT2 que contribuye, no que causa, a la neurodegeneración. Estos argumentos apoyan la hipótesis de la excitotoxicidad por glutamato e implican a las células de glía en el mecanismo de degeneración de las motoneuronas. Probablemente la excitotoxicidad por glutamato tenga un papel en la progresión de la enfermedad, más que en el inicio (Pardo, 2006). Además, en algunos pacientes con ELA esporádica se ha observado un aumento de la concentración de glutamato en líquido cefalorraquídeo (LCR) (Rothstein 2009).

Una lección crucial del modelo SOD1 es la del papel de la **glía**. Parece que la tasa de progresión de la enfermedad, una vez iniciada en las motoneuronas, puede estar dirigida por la glía circundante (Turner, 2008). La expresión selectiva de SOD1 mutada en astrocitos causa gliosis reactiva sin que se desarrolle la enfermedad, lo cual sugiere que los astrocitos no inician el proceso patogénico (Turner 2008). La reducción de la expresión de SOD1 mutada en las células de microglía no tiene efecto sobre el inicio de la enfermedad pero reduce la progresión. Puede que SOD1 mutada en las neuronas inicie el proceso patogénico y que el acúmulo en células de microglía acelere la progresión de la enfermedad (Kato 2008).

- *Ensayos terapéuticos en modelo SOD1*

El modelo animal ha permitido el desarrollo de ensayos terapéuticos. Hasta la fecha se han probado más de 150 potenciales tratamientos, dirigidos contra los mecanismos tóxicos postulados, entre ellos antioxidantes, antiapoptóticos, factores anti-agregación, anti-excitotoxinas, antiinflamatorios y factores neurotróficos (Turner, 2008). Desafortunadamente los tratamientos que se han demostrado beneficiosos en los ratones transgénicos no lo han sido cuando se han probado en ensayos clínicos en humanos.

Un claro ejemplo de ello fue el ensayo clínico en fase III con minociclina. En ensayos anteriores en modelos animales, la minociclina había demostrado efecto neuroprotector (presumiblemente por un efecto antiapoptótico y antiinflamatorio) sobre modelos de traumatismo, isquemia cerebral, y enfermedades neurodegenerativas, entre ellas el modelo transgénico SOD1 de

ELA, aumentaba la supervivencia de los ratones un 10-22%. Sin embargo, en el ensayo en fase III en el que se incluyeron a 412 pacientes, el grupo tratado con minociclina presentó un declinar más rápido en la función motora que el grupo con placebo (Gordon, 2007).

- *Diferencias neuropatológicas con ELA esporádica*

Como se ha comentado anteriormente existen diferencias entre la histopatología de SALS y la de FALS asociada a SOD1 y modelos animales para SOD1 (Kato, 2008) que se resumen en la tabla 2.

En SALS la degeneración del haz corticoespinal es más evidente, sobre todo en los segmentos espinales inferiores; en el modelo SOD1 predomina afectación severa motoneurona inferior, mientras que la degeneración del tracto corticoespinal es leve o media.

Los cuerpos de Bunina y las inclusiones TDP 43 positivas típicas de SALS y también de FALS no asociada a SOD1 mutada, no están presentes en modelo SOD1. Para finalizar, en el modelo animal SOD1 se objetivan vacuolas de diferente tamaño en el soma, dendritas y axón de las motoneuronas, especialmente en fases iniciales, que provienen del retículo endoplásmico y de las mitocondrias. Estas vacuolas no se encuentran en autopsias de pacientes con FALS asociada a SOD1, ni en no-SOD1 ni en SALS (Kato, 2008).

	SALS y FALS no SOD1	FALS-SOD1	Modelo transgénico SOD1
Histología	Degeneración más evidente del haz corticoespinal , sobre todo en segmentos espinales inferiores	Predomina afectación motoneurona inferior  También afectación de columna posterior medular	Vacuolas  Predomina afectación motoneurona inferior  También afectación de columna posterior medular
Inclusiones	Cuerpos de Bunina  Inclusiones TDP 43+ y FUS+	LBHIs y algunas Ast-HIs (SOD1+)	LBHIs y Ast-HIs (SOD1+)

**Tabla 2:** Diferencias neuropatológicas entre ELA en humanos y modelo animal SOD1 .

Estas diferencias neuropatológicas nos indican que quizá la vía de neurodegeneración en las formas esporádicas y en las familiares asociadas a SOD1 que representa este modelo animal podría ser diferente. Si sumamos la falta de de respuesta en ensayos terapéuticos, es manifiesto que el modelo transgénico de SOD1 no refleja con precisión los más comunes casos esporádicos y por ello se ha puesto en cuestión este modelo y su utilidad para investigación de opciones terapéuticas.

### 3.3 Modelo TDP43

El desarrollo de un modelo animal transgénico de TDP43 mutada ha sido más complicado ya que la mayoría de los roedores morían poco después de nacer, indicando una elevada toxicidad y un efecto sobre el desarrollo de TDP43 (Wegorzewska, 2011). Por ello desarrollaron sistemas reguladores de la expresión del gen de TDP43 mutado sólo de forma postnatal. Se han creado modelos roedores con diferentes mutaciones en el gen de TDP43 humano y

## *Introducción*

con diferentes niveles de expresión de proteína mutada, así como sobreexpresión del enzima normal. El fenotipo desarrollado por estos animales transgénicos en cuanto al momento de inicio y severidad de la enfermedad dependía de la dosis de TDP43 y del momento en el que se iniciaba la expresión de TDP43 mutada (prenatal vs postnatal), variando desde un fenotipo muy severo con muerte a los pocos días de nacer hasta un fenotipo con enfermedad motora progresiva de varios meses de evolución. El hecho de que algunos modelos transgénicos con expresión o sobreexpresión embrionaria de la proteína presenten un fenotipo tan agresivo puede indicar un papel importante de TDP43 en el desarrollo. De estos modelos se infiere además que la expresión de TDP43 mutada es causante de neurodegeneración de una forma dosis dependiente, y que existe un efecto umbral a partir del cual la sobreexpresión de TDP43 es tóxica (Wegorzewska, 2011).

Una característica de estos modelos es que mientras que las inclusiones ubiquitinizadas son abundantes en las neuronas vulnerables antes de la degeneración, estas inclusiones raramente eran inmunorreactivas para TDP43 (Wegorzewska, 2011). Sin embargo sí se ha descrito una distribución difusa de TDP43 fosforilada en el citoplasma (Zhou, 2010) así como pérdida de tinción nuclear (Wegorzewska, 2011).

En este modelo, la neurodegeneración afecta de forma principal a motoneuronas, predominantemente a las motoneuronas superiores (a diferencia del modelo SOD1) pero la neurodegeneración es más amplia,

afectando también a otras regiones corticales, hipocampo y cerebelo (Wegorzewska, 2011; Zhou, 2010).

La neurodegeneración se acompaña de una activación astrocitaria y de la microglía circundante a las motoneuronas (Wegorzewska, 2011). A diferencia de los que ocurre en el modelo SOD1, los promotores utilizados en algunos modelos de TDP43 hacen que la expresión de TDP43 mutada sea exclusiva de neuronas, sugiriendo por tanto que la toxicidad por TDP43 podría comenzar en las motoneuronas de forma autónoma (Wegorzewska, 2011).

En cuanto a las posibles vías por las que TDP43 estaría implicada en el proceso de neurodegeneración, algunos autores apuestan por una hipótesis “citoplasmática” ya sea por la presencia de inclusiones con agregados de TDP43 citoplasmáticas o bien porque los fragmentos C-Terminales de la proteína tengan directamente un papel tóxico. Por otro lado, hay quien apuesta por una teoría de pérdida o alteración de la función de TDP43 en el núcleo. (Wegorzewska, 2011)

### **3.4 Modelo FUS**

Tras el descubrimiento de la implicación de la proteína FUS en ELA en humanos, se han desarrollado un modelo transgénico de FUS con ratas. En este modelo, la sobreexpresión de FUS mutada R521C (con sustitución de arginina por cisteína en la posición 521) tras el nacimiento, causa una pérdida de función motora progresiva, a la que se añaden en estadios finales déficits de aprendizaje y memoria. Se observa una severa axonopatía de motoneuronas,

sin que haya una reducción significativa del número de motoneuronas en la médula espinal, con atrofia muscular esquelética, así como pérdida de neuronas corticales frontales e hipocampales. Se encuentran además inclusiones ubiquitinizadas en neuronas corticales y de médula espinal, pero no estaban colocalizadas con FUS. No se encontraron inclusiones de FUS, pero se observaba inmunorreactividad en el núcleo y difusa en el citoplasma. La neurodegeneración iba acompañada de activación de astrocitos y microglía. Este modelo presenta por tanto características similares a ELA y DFT (Huang, 2011).

La sobreexpresión de FUS normal humana no causaba enfermedad de motoneurona pero se observaba un déficit de aprendizaje y memoria junto con pérdida de neuronas corteza frontal e hipocampal a edad avanzada (Huang, 2011). Los ratones knock-out para el gen FUS mueren inmediatamente después de nacer (Van den Bosch, 2011).

### **3.5. Modelos basados en otras formas poco frecuentes de FALS**

- **Gen Alsina:** mutación descrita en raras formas familiares autosómico recesivas de inicio juvenil. Se cree que juega un papel en la organización de membrana celular y el transporte intracelular (Kato, 2008). Se han creado cuatro modelos de ratón knock-out, sin embargo, no desarrollan un claro fenotipo motor (Van den Bosch 2011).
- **Gen VAPB** (*vessicle-associated membrane protein B*): mutación descrita en algunas familias con inicio tardío y lenta progresión de la enfermedad. El ratón transgénico que expresa VAPB mutada no presenta déficit motor ni

menor supervivencia, pero se observan inclusiones de TDP43 en las motoneuronas espinales (Van den Bosch, 2011).

- **Gen Dinactina:** La proteína dinactina está implicada en el transporte axonal retrógrado. Se ha descrito su mutación en una familia con una enfermedad de motoneurona de inicio tardío, con herencia autosómica dominante. El ratón con el gen mutado en heterocigosis presenta una enfermedad de motoneurona con acúmulo de proteínas citoesqueléticas y de las vesículas sinápticas, pérdida de motoneuronas y astrogliosis. El ratón homocigoto muere en la etapa embrionaria (Van den Bosch, 2011).

### **3.6. Otros modelos**

- **Neurofilamentos:** Se han creado modelos knock-out o con sobreexpresión de neurofilamentos, sin que presenten un fenotipo de enfermedad de motoneurona. Sin embargo el ratón transgénico con NF-L mutado (subunidad ligera de los neurofilamentos) presenta una degeneración selectiva de motoneuronas con acúmulos de neurofilamentos, aunque no se ve afectada su supervivencia (Van den Bosch, 2011).

- **Periferina:** Los ratones que sobreexpresan periferina, una proteína de los filamentos intermedios presente en inclusiones de pacientes con ELA y cuya mutación se ha descrito en algunos casos de ELA, presentan pérdida de axones motores e inclusiones en las motoneuronas, desarrollando disfunción motora de inicio tardío (Van den Bosch, 2011).

- **Factores neurotróficos:** También se han creado ratones transgénicos para genes de factores neurotróficos como CNTF (*Ciliary neurotrophic factor*) y VEGF (*vascular endothelial growth factor*), la ausencia de estos factores causa una lentamente progresiva pérdida de motoneuronas con la edad (Van den Bosch, 2011).

### **3.7 Limitaciones de los modelos experimentales de ELA**

Hasta la fecha sólo el modelo SOD1 ha sido utilizado para probar alternativas terapéuticas. El fracaso de los ensayos terapéuticos en pacientes con ELA y las diferencias neuropatológicas existentes entre los pacientes con ELA esporádica y el modelo transgénico SOD1 sugieren que posiblemente las dos formas de la enfermedad tengan vías patogénicas diferentes.

El desarrollo de modelos basados en TDP43 y FUS, inclusiones típicas de la ELA esporádica tampoco reproducen con exactitud la neuropatología encontrada en los pacientes, y la degeneración no es exclusiva de motoneuronas.

Todos estos modelos se basan en modificaciones genéticas, y ninguno de ellos representa con fidelidad a los pacientes con ELA esporádica. Sería por ello fundamental encontrar un modelo animal que se correlacione con la ELA esporádica, para un mejor entendimiento de las vías implicadas en la patogenia de la enfermedad y sobre todo para el desarrollo de potenciales terapias.

#### **4. TOXICIDAD DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE LOS PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

La posibilidad de que los materiales biológicos procedentes de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica, tanto en su forma familiar como esporádica, presenten algún tipo de elemento capaz de causar un efecto tóxico ha sido descrita por diferentes autores, que muestran cambios bioquímicos o ultraestructurales en cultivos celulares con suero y principalmente con líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con ELA. Además, no se ha podido demostrar un efecto similar en otras enfermedades neurodegenerativas (Matías-Guiu, 2010).

El LCR contiene proteínas liberadas al espacio extracelular por las células afectadas, que pueden servir como biomarcadores en las enfermedades neurodegenerativas (Matías-Guiu, 2010). La identificación de estos factores sería por tanto útil en el diagnóstico, pronóstico y en la monitorización de la respuesta a tratamiento (Anneser, 2006).

En la ELA el patrón de progresión clínica de la enfermedad sugiere una propagación del daño neural a grupos de motoneuronas adyacentes. El LCR podría ser el medio de difusión de factores tóxicos desde áreas afectadas a otras vecinas (Shaw, 2002). La identificación del factor responsable del efecto tóxico del LCR-ELA podría mejorar nuestro entendimiento de la patogénesis de la ELA y posiblemente ayudaría a desarrollar nuevas terapias (Anneser, 2006).

Varios autores han apostado por el glutamato como el factor tóxico responsable, que mediaría su efecto tóxico directo a través de los receptores

AMPA, NMDA o GLT-1 astrocitario, aunque no ha podido ser demostrado. Otros candidatos propuestos son marcadores de metabolismo oxidativo, mediadores proapoptóticos o bien mediadores inflamatorios (Matías-Guiu, 2010).

El efecto tóxico del LCR-ELA en cultivos celulares es mayor sobre motoneuronas, y es más intenso cuando hay más células gliales en el cultivo (Matías-Guiu, 2010). Aunque Anneser y cols demostraron también efecto citotóxico del LCR-ELA en un experimento con cultivos compuestos mayoritariamente por motoneuronas, con un porcentaje muy bajo de células gliales (<20%) (Anneser, 2006).

En cuanto a la vulnerabilidad celular específica de las motoneuronas en la ELA y ante el efecto citotóxico selectivo del LCR-ELA sobre éstas, la principal hipótesis se ha basado en la teoría de la excitotoxicidad por glutamato, indicando que las motoneuronas tienen una mayor densidad de receptores AMPA permeables al calcio que otros subtipos de neuronas (Van Den Bosch, 2000). También se ha justificado en la menor capacidad buffer de las motoneuronas frente al incremento de calcio intraneuronal (Sen, 2005).

A continuación se describen los experimentos que demuestran citotoxicidad del LCR-ELA, realizados tanto *in vitro*, sobre cultivos celulares con motoneuronas en presencia de LCR-ELA, como en modelos animales *in vivo* mediante la inyección de LCR-ELA en el espacio subaracnoideo o intraventricular. Para facilitar la lectura, se dividen en epígrafes según el posible mecanismo de toxicidad del LCR-ELA propuesto por los autores.

#### **4.1 Citotoxicidad del LCR-ELA *in vitro***

*- Glutamato y excitotoxicidad*

Muchos de los experimentos para analizar la toxicidad del LCR-ELA sobre cultivos celulares se han basado en la hipótesis de la excitotoxicidad por glutamato. Así Couratier y cols describen una reducción de la tasa de supervivencia en los cultivos de motoneuronas de rata tras añadir LCR-ELA, que se podía evitar con un antagonista de los receptores AMPA/kainato, pero no ocurría así al con antagonistas del receptor NMDA (Couratier, 1993).

También apuntaba a un papel preferente del receptor AMPA/kainato el estudio de Sen y cols. Este grupo diseñó un experimento con cultivos de médula espinal de rata en el que incluyen tanto motoneuronas como otro tipo de células, para analizar la vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas frente a los otros tipos neuronales. Basándose en la hipótesis de la excitotoxicidad por glutamato, miden los niveles de calcio intracelular en los diferentes tipos de neuronas tras la adición de LCR-ELA en los cultivos. Observan que en ambos tipos celulares aumenta el calcio intracelular, pero en motoneuronas los niveles eran mayores y durante un tiempo más prolongado, probablemente por una menor capacidad buffer de las motoneuronas. La entrada de calcio se producía principalmente a través de receptores AMPA/kainato. Observaron además cambios morfológicos y menor tasa de supervivencia de las motoneuronas. El rápido efecto les hizo plantear que el factor tóxico del LCR activaría directamente los receptores de glutamato. Los antagonistas de receptores de glutamato, evitaban estos efectos tóxicos. Plantean que la vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas pueda deberse en parte a una mayor entrada de

calcio a través de los receptores AMPA y a una menor capacidad de tamponar el calcio intracelular, que causarían un mayor aumento de calcio tras el estímulo por glutamato (Sen, 2005).

Anneser y cols barajaban inicialmente la hipótesis de que el glutamato podría ser el candidato factor tóxico del LCR-ELA. En este caso utilizaron cultivos de motoneuronas embrionarias de ave. Observaron una reducción de la tasa de supervivencia de las motoneuronas tras la adición de LCR-ELA (medido como inmunohistoquímica con el marcador de neurofilamentos SMI-32), así como un mayor número de células apoptóticas, con fragmentación de DNA y núcleos condensados. Sin embargo, este efecto citotóxico no se reproducía si sólo añadían glutamato en los cultivos (a concentraciones superiores a las encontradas en LCR de pacientes con ELA). Por lo tanto, concluyeron que debe existir algún otro factor que contribuya a la toxicidad. La adición de antagonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo I prevenía estos efectos citotóxicos. En este estudio, es además interesante destacar, que demostraron la toxicidad tanto en cultivos mixtos de motoneuronas y células gliales, como en cultivos compuestos mayoritariamente por motoneuronas (Anneser, 2006).

Los hallazgos del estudio de Yañez y cols en cultivos de neuronas de corteza motora de rata sin embargo apoyan un efecto tóxico con aumento del calcio intracelular independiente del glutamato. Observaron una elevación del calcio intracelular en motoneuronas, un aumento de actividad LDH y una menor viabilidad neuronal en los cultivos tratados con LCR-ELA. Al incubar los cultivos con glutamato se demostró que era necesaria una concentración

## *Introducción*

umbral para causar neurotoxicidad, y sin embargo la concentración de glutamato en LCR-ELA era menor que este umbral, lo cual indica que hay otros factores tóxicos que son independientes del glutamato.

En este experimento la adición de antagonistas de los receptores NMDA y AMPA no prevenían la toxicidad causada por LCR-ELA, y sí la causada por glutamato. Sorprendentemente tampoco el riluzole redujo la citotoxicidad por LCR-ELA. De forma interesante, el agente antioxidante resveratrol sí que protegía de la elevación de calcio y los efectos neurotóxicos causados por el LCR-ELA. Además el riluzole antagonizaba este efecto protector del resveratrol. Estos resultados indican un mecanismo de toxicidad independiente del glutamato. Los autores apuntan al estrés oxidativo ligado a la elevación de calcio como implicado en la neurodegeneración (Yañez, 2011).

Este estudio tiene importantes implicaciones ya que, el único tratamiento aprobado en la actualidad para los pacientes con ELA, tras demostrar una discreta mejoría de la supervivencia, es el riluzole, un modulador de la transmisión glutamatérgica.

Basándose en que la excitotoxicidad por glutamato puede deberse a una deficiente recaptación de la sinapsis por parte de los transportadores de glutamato glial, Shobba y cols analizan el efecto del LCR-ELA sobre la expresión del transportador de glutamato glial GLT-1. Los cultivos de células de médula espinal de rata expuestos a LCR-ELA mostraban niveles reducidos de GLT-1 en astrocitos en comparación con los otros cultivos. Además encontraron células vacuoladas. Si 24 horas después de la exposición al LCR-

ELA añadían L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, se reducía la actividad de LDH.

GLT-1 se encarga de eliminar exceso de glutamato en la sinapsis, la reducción de su expresión llevaría a un acúmulo de glutamato extracelular que podría llevar a la muerte celular por excitotoxicidad, por tanto especulan que GLT-1 podría ser el mediador del papel de la astrogliá en ELA (Shobba, 2007).

A pesar de los argumentos a favor de que el glutamato sea el factor responsable de la toxicidad del LCR-ELA, como se ha descrito, hay otros que van en contra de esta hipótesis. Los estudios sobre la concentración de glutamato en LCR de los pacientes con ELA no son concluyentes, Tikka en un estudio que se describe más adelante demostrando toxicidad del LCR-ELA, encuentra unas concentraciones de glutamato que no diferían de las de los LCR control (Tikka, 2002); además Anneser y Yañez han demostrado que el glutamato no causa toxicidad a las concentraciones que se encuentra en LCR. Por otro lado, los resultados de la adición de antagonistas de los receptores de glutamato son dispares y además Yañez observa una falta de respuesta al riluzole.

- *Metabolismo oxidativo*

En cuanto a la posibilidad de que el efecto tóxico esté mediado por el metabolismo oxidativo, además de los resultados con resveratrol descritos por Yañez y cols, anteriormente Terro y cols demostraron que la toxicidad de LCR-ELA sobre cultivos de células corticales de rata era parcialmente bloqueada

con agentes antioxidantes como vitamina E o alopurinol, y se observaba un mayor efecto cuando se administraban combinados (Terro, 1996). Smith y cols observaron que si el LCR-ELA contenía niveles elevados de 4-hidroxinonal, un producto de peroxidación lipídica, causaba un aumento de la muerte celular (Smith, 1998).

- *Importancia de la glía*

En cuanto al papel de la glía, destaca el estudio de Tikka y cols. Los autores observaron en cultivos de motoneuronas espinales que el LCR-ELA aumentaba la proporción de neuronas apoptóticas, que presentaban fragmentación del DNA. También observaron defosforilación de neurofilamentos y proliferación de células microgliales. La administración de antagonistas de los receptores de glutamato AMPA/kainato o NMDA en los cultivos celulares previo al LCR-ELA evitaba la muerte celular pero no la proliferación microglial, sugiriendo que los receptores ionotrópicos de glutamato median la muerte celular independientemente de la microgliosis. La administración de minociclina, que inhibe la activación microglial, evitaba tanto la neurodegeneración como la proliferación microglial, sugiriendo que la proliferación microglial no es secundaria a la muerte neuronal, sino que contribuye a ésta (Tikka, 2002).

Anneser y cols hicieron un cultivo sólo de células gliales de médula espinal de ave y observaron que la adición de LCR-ELA causaba una proliferación astrogliar que se podía bloquear con un antagonista del receptor metabotrópico de glutamato del grupo I (mGlutR I) (Anneser, 2004).

- *Otros cultivos*

Para los experimentos *in vitro* también se han utilizado células de la línea NSC-34 (híbridas de motoneuronas espinales y neuroblastoma de ratón), en estos cultivos no hay células gliales. Con estos estudios se ha podido comprobar que la citotoxicidad del LCR-ELA afecta preferentemente a las neuronas diferenciadas. Las motoneuronas diferenciadas presentaban vacuolas, agregados de neurofilamentos fosforilados y ubiquitinizados especialmente en la zona perinuclear, citoplasma y neuritas. Además una menor tasa de supervivencia, con aumento de la actividad de LDH en los cultivos tras la adición de LCR-ELA. También se ha observado un menor número de células diferenciadas con respecto a controles (Vijayalakshmi, 2009).

El mismo grupo, con este tipo de cultivo, comprobó que el factor VEGF atenuaba los cambios degenerativos descritos en motoneuronas, apostando por su efecto neuroprotector y potencialmente terapéutico (Kulshreshtha, 2011).

En un experimento que se detalla más adelante, realizado en modelo *in vivo* y con cultivo de células NSC-34, los autores muestran un aumento de expresión de marcadores de estrés de retículo endoplásmico y cambios en la morfología del mismo tras la adición de LCR-ELA (Vijayalakshmi, 2011).

## Introducción

Se esquematizan en tablas los resultados de toxicidad (Tabla 3) y cambios bioquímicos y estructurales (Tabla 4) causados por el efecto tóxico del LCR-ELA en los experimentos sobre cultivos celulares descritos.

Una de las cuestiones que dificulta la interpretación de los resultados de los diferentes estudios descritos es su variación metodológica, ya que no siguen un criterio común a la hora de cuantificar la citotoxicidad del LCR-ELA. Esto dificulta la comparabilidad de los estudios y por tanto la interpretación de sus distintos resultados.

Autor	Cultivo	Hallazgos
<i>Couratier, 1993</i>	Cultivo de neuronas de rata	Menor supervivencia celular (47% LCR-ELA vs 80% controles)
<i>Terro, 1996</i>	Células corticales de rata	Incrementa tasa de muerte neuronal casi el triple
<i>Smith, 1998</i>	Células VSC-4,1	Si LCR tiene valores elevados de 4-hidroxinonenal incrementa muerte neuronal un 50%
<i>Tikka, 2002</i>	Células de médula espinal de rata embrionaria	Reducción de un 34% de la supervivencia neuronal
<i>Sen, 2005</i>	Células de médula espinal de rata embrionaria	Reducción de un 50% de la supervivencia celular
<i>Anneser, 2006</i>	Cultivo rico en motoneuronas de médula espinal de ave embrionaria	Reducción de un 10% de la supervivencia celular
<i>Anneser, 2006</i>	Cultivo mixto de motoneuronas y glía de médula espinal de ave embrionaria	Reducción de un 50% de la supervivencia celular
<i>Vijayalakshmi, 2009</i>	Células NSC-34	Reducción de un 40% de la supervivencia celular
<i>Yañez, 2011</i>	Neuronas corteza motora de rata fetal	Reducción de la viabilidad neuronal un 20-30%

**Tabla 3:** Efecto tóxico del LCR-ELA sobre cultivos celulares (Adaptado de Matías-Guiu, 2010).

## Introducción

Autor	Cultivo	Hallazgos
<i>Nagajara, 1994</i>	Células de médula espinal de ave embrionaria	Aumento de NF fosforilados
<i>Tikka, 2002</i>	Células de médula espinal de rata embrionaria	Fragmentación de ADN, signos apoptóticos. Defosforilación de NF Proliferación de microglía
<i>Anneser, 2004</i>	Células gliales procedentes de embrión de ave	Aumento de la proliferación astrocitaria y la expresión de vimentina
<i>Sen, 2005</i>	Células de médula espinal de rata embrionaria	Retracción neurítica, edema celular, vacuolización citoplasmática, muerte celular. Elevación de calcio, más intensa y prolongada en motoneuronas.
<i>Anneser, 2006</i>	Cultivo rico en motoneuronas de médula espinal de ave embrionarias	Fragmentación del ADN, núcleos condensados
<i>Shobba, 2007</i>	Células de médula espinal de rata embrionaria	Vacuolas Expresión de GLT-1 disminuida en astrocitos
<i>Gunasekaran, 2009</i>	Células de médula espinal de rata embrionaria	Disminuye expresión de canales Na <sub>v</sub> 1.6 y K <sub>v</sub> 1.6.
<i>Vijayalakshmi, 2009 Kulshreshtha, 2011</i>	NSC-34	Menos motoneuronas (MN) diferenciadas Las MN diferenciadas presentaban vacuolas, agregados de NF fosforilados y ubiquitinizados Aumento de LDH
<i>Shobba, 2010</i>	Células de médula espinal de rata embrionaria	Cambio morfología astrocitos (planos → ramificados). Sobreexpresión GFAP y S100β
<i>Vijayalakshmi, 2011</i>	Células NSC-34	Aumento de la expresión de GRP-78 y caspasa-12, como marcadores de estrés de RE. RE con cisternas fragmentadas y polirribosomas libres alrededor
<i>Deepa, 2011</i>	Células de médula espinal de rata embrionaria	Aumento de NF fosforilados
<i>Yañez, 2011</i>	Neuronas corteza motora de rata fetal	Elevación de calcio, aumento de LDH

**Tabla 4:** Cambios bioquímicos y ultraestructurales por el efecto tóxico de LCR-ELA sobre cultivos celulares (Adaptado de Matías Guiu, 2010).

## **4.2 Citotoxicidad del LCR-ELA *in vivo***

A raíz de los primeros estudios que demostraban toxicidad del LCR de pacientes con ELA sobre cultivos de motoneuronas, se desarrollaron una serie de experimentos para tratar de demostrar esta citotoxicidad *in vivo*.

El primero de ellos en 1995 fue llevado a cabo por Rao y cols (Rao, 1995). La técnica consistía en inyectar en el espacio subaracnoideo de ratas de 3 días de edad, LCR procedente de pacientes con ELA y de controles con otras enfermedades neurológicas. Después de 48 horas obtuvieron secciones de médula espinal lumbar y analizaron la inmunorreactividad con el anticuerpo SMI-31 que marca neurofilamentos fosforilados. Se observó un aumento significativo de tres veces el número de somas marcados con SMI-31 en el asta ventral de la médula espinal de las ratas expuestas a LCR de pacientes con ELA. El grupo había obtenido resultados similares previamente sobre cultivos de células de médula espinal de ave embrionarias (Nagajara, 1994). Indican que esta hiperfosforilación de neurofilamentos podría ser un estadio inicial de los cambios degenerativos de las motoneuronas expuestas a algún factor presente en el LCR de los pacientes con ELA.

Los siguientes experimentos se realizaron siguiendo la misma metodología descrita por Rao y cols, es decir, mediante inyecciones en el espacio subaracnoideo de LCR de pacientes con ELA y controles sanos en ratas de 3 días de edad, obteniendo secciones de médula espinal tras 48 horas, con los resultados que se exponen a continuación, y se sintetizan en la Tabla 4.

- *Implicación de las células gliales*

Shahani y cols en 1998 (Shahani, 1998) evidenciaron por primera vez una activación de la glía en respuesta a la inyección de LCR-ELA, demostrando un aumento del número de astrocitos intensamente inmunorreactivos para GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) en sustancia blanca y en sustancia gris de la médula espinal de las ratas expuestas a LCR-ELA frente a LCR-control.

Los autores posteriormente plantean un posible mecanismo inmune de la citotoxicidad del LCR-ELA y muestran que la administración de una sola dosis de ciclofosfamida (droga inmunosupresora) intratecal 24 horas después de la inyección de LCR, atenúa de forma significativa la fosforilación aberrante de neurofilamentos, la actividad de LDH y la intensidad y número de astrocitos inmunorreactivos para GFAP. Postulan un efecto inhibitor de ciclofosfamida sobre las kinasas que fosforilan neurofilamentos y un efecto alquilante inhibiendo la proliferación astrocitaria (Shahani, 2001).

Años más tarde, el grupo publicó un estudio análogo, en el que realizaban una inyección de deprenilo (inhibidor de la monoaminoxidasa B) 24 horas tras la exposición al LCR-ELA y observaron que también atenúa los cambios degenerativos en la médula espinal. El deprenilo ha mostrado, además de su efecto bloqueador de la deaminación de monoaminas, efecto antioxidante, antiapoptótico y neuroprotector en diferentes modelos de neurodegeneración. Puede modificar la expresión génica y síntesis de diferentes proteínas tales como factores neurotróficos y proteínas implicadas en apoptosis que podrían explicar su efecto neuroprotector. Especulan que el deprenilo podría revertir los efectos tóxicos del LCR en este modelo reduciendo el estrés oxidativo,

previniendo el malfuncionamiento mitocondrial y mediante soporte neurotrófico (Shahani, 2004).

Shobba y cols también analizaron la expresión del transportador de glutamato glial GLT-1 en el modelo in vivo, observando una expresión de GLT-1 disminuida en los astrocitos de la sustancia gris de la médula espinal de las ratas tratadas con LCR-ELA intratecal (Shobba, 2007).

El mismo grupo, en 2010 observa que los astrocitos de las médulas espinales expuestas a LCR-ELA expresan más GFAP y S100 $\beta$ , una proteína de unión a calcio que podría indicar un aumento en la afluencia de calcio. Estos cambios ocurrían especialmente en aquellos astrocitos que rodean a las motoneuronas. De forma paralela realizaron el experimento sobre cultivos de células de médula espinal de rata embrionaria obteniendo resultados similares. Además observaron que los astrocitos en cultivos tratados con LCR-ELA presentaron cambios morfológicos, habiendo un mayor número de astrocitos con prolongaciones frente a astrocitos "planos". Se sabe que los astrocitos "planos" liberan factores tróficos en cultivos celulares, mientras que los ramificados podrían liberar factores tóxicos como óxido nítrico, citoquinas o glutamato; por lo tanto, una disminución del número de astrocitos "planos" conllevaría una reducción del soporte trófico para las motoneuronas (Shobha, 2010).

- *Efecto sobre la expresión de canales iónicos*

Con la misma metodología también demuestran que el LCR-ELA puede alterar la expresión de canales iónicos de motoneuronas. En el modelo SOD1 se describieron alteraciones de los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje. Observan que en motoneuronas de las ratas tratadas con LCR-ELA, disminuye la expresión de canales  $\text{Na}^+$  1.6 y  $\text{K}^+$  1.6 dependientes de voltaje, ya que mostraban una menor inmunorreactividad que las tratadas con LCR control. Cuando se trataban con una dosis de los factores neurotróficos BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) o CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) se revertía el efecto sólo sobre los canales de sodio, pero continuaban las alteraciones de los canales de potasio. También hicieron el mismo estudio sobre cultivos de motoneuronas obteniendo resultados similares. Postulan que la alteración de canales iónicos en ELA podría interferir con la actividad eléctrica neural y llevar a neurodegeneración (Gunasekaran, 2009).

- *Efecto tóxico sobre organelas de las motoneuronas*

Ramamohan y cols basándose en una posible disfunción del aparato de Golgi como evento temprano en la degeneración de las motoneuronas, observan con microscopía electrónica los cambios de esta organela tras la inyección de LCR-ELA. LCR-ELA causa una fragmentación del aparato de Golgi en numerosos pequeños elementos dispersos en el citoplasma que se confirma con una inmunorreactividad difusa con anticuerpos frente a la sialoglicoproteína de membrana de las cisternas mediales del aparato de Golgi

MG160. Esta fragmentación podría deberse a una mala función de los microtúbulos que mantienen la integridad del complejo de Golgi. La disfunción del Golgi puede dar lugar a un acúmulo de proteínas aberrantes que alteren el transporte intracelular y afecten la supervivencia celular (Ramamohan, 2007).

En otro artículo publicado por el grupo analizan la expresión de marcadores de estrés de retículo endoplásmico, observando que en las ratas tratadas con LCR-ELA aumenta la expresión de GRP-78 (*78 kDa glucose-regulated protein*), una chaperona que promueve el ensamblaje normal de las proteínas, así como la expresión de pro-caspasa 12 y caspasa-12 activa indicativas de fenómenos de apoptosis. Estos cambios ocurrían no sólo en las motoneuronas del asta anterior, sino también en los astrocitos. En cultivos de células de la línea NSC-34, se observa un aumento de la expresión de GRP-78 con inmunorreactividad de localización difusa por el citoplasma e incluso en el núcleo (a diferencia de los controles donde es perinuclear). También presentaban una intensa tinción para caspasa-12. También observan cambios ultraestructurales del RE con microscopía electrónica, con cisternas fragmentadas y polirribosomas libres alrededor. La presencia de inclusiones ubiquitinizadas en ELA indicativas de proteínas mal plegadas podrían ser una causa o un efecto del estrés de RE (Vijayalakshmi, 2011).

- *Déficit de factores neurotróficos*

En un último artículo plantean que un déficit de factores tróficos podría favorecer el proceso de neurodegeneración en ELA. Analizan la expresión de

## Introducción

factores de crecimiento implicados en supervivencia neuronal como BDNF, FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) e IGF1 en el modelo en ratas. Demuestran que en las ratas tratadas con LCR-ELA, los niveles de mRNA de todos estos factores están significativamente reducidos con respecto al grupo control. Por otro lado, observan que la administración de BDNF revierte las alteraciones que causa el LCR-ELA sobre los neurofilamentos fosforilados (Deepa, 2011).

En la siguiente tabla se resumen los hallazgos de los experimentos *in vivo* descritos:

Autor	Hallazgos en modelo "in vivo"
Rao , 1995	Fosforilación aberrante de neurofilamentos
Shahani , 1998	Aumento del número de astrocitos intensamente inmunorreactivos para GFAP en sustancia blanca y en sustancia gris
Shahani 2001, Shahani 2004	Fosforilación aberrante de NF Aumento de LDH Astrocitosis reactiva
Shobha , 2007	Expresión de GLT-1 disminuida en astrocitos de sustancia gris
Ramamohan , 2007	Fragmentación Golgi
Gunasekaran , 2009	Disminuye expresión de canales $Na_v1.6$ y $K_v1.6$ .
Shobha , 2010	Sobreexpresión GFAP y S100 $\beta$
Vijayalakshmi , 2011	Estrés RE: Aumenta expresión GRP-78 y caspasa 12 activa.
Deepa , 2011	Baja expresión de factores tróficos BDNF, FGF2, IGF2

**Tabla 5:** Cambios bioquímicos y ultraestructurales en las secciones de médula espinal de las ratas inyectadas con LCR-ELA de forma intratecal.

- *Valoración clínico-neurofisiológica del efecto citotóxico*

Sankaranarayani y cols por primera vez incluyen exploraciones de la función motora de las ratas. La técnica es diferente a los anteriores estudios, son ratas de 90-120 días de edad a las que inyectan intraventricularmente mediante una cánula colocada en el ventrículo lateral LCR-ELA o bien LCR control. Realizan una exploración en una plataforma giratoria y miden la fuerza de las 4 extremidades, en primer lugar basal tras cirugía, sin inyección de LCR, y posterior a la infusión a las 24 horas, y en los días 2, 5, 8 y 10. Observan que en el grupo con LCR-ELA inicialmente disminuye el tiempo que las ratas se mantienen en la plataforma giratoria a las 24 y 48 horas, sin embargo en las siguientes exploraciones no hay diferencias con respecto al grupo control. Los autores plantean que pueda deberse a un efecto de entrenamiento, o bien a que el daño causado por la infusión única de LCR sea puntual. Al medir la fuerza de las extremidades, se observa que disminuye la fuerza extremidades anteriores hasta 10 días después de la infusión. Además observan cambios en el comportamiento espontáneo de la rata (dedican menos tiempo al aseo). También analizan la actividad cortical de y observan diferencias en los potenciales de corteza motora con respecto a controles. En este estudio no incluyen estudio anatomopatológico (Sankaranarayani, 2010).

### **4.3 Correlación clínica del efecto citotóxico**

Pocos artículos describen si los distintos subtipos de ELA presentan diferente citotoxicidad, o si se correlaciona con la duración de la enfermedad.

Tikka y cols refieren que los LCR procedentes de pacientes con SALS (16 pacientes) y FALS (10 pacientes) tanto SOD1 como no SOD1, presentaron una toxicidad similar en cultivos y no encontraron relación con el tiempo de evolución de la enfermedad (Tikka, 2002).

En el estudio de Yañez y cols con LCR procedente de 27 pacientes con ELA, encuentran que un 75% de ellos muestran citotoxicidad, pero no ocurre así con el 25% restante. Quizá esto explica por qué algunos autores no habían objetivado citotoxicidad anteriormente. Es interesante que en este estudio por primera vez se estudió la correlación entre las características clínicas de los pacientes con ELA y la toxicidad de los LCR, valorando la asociación con edad, sexo, forma clínica, tiempo de evolución, gravedad medida por la escala ALSFRS o la afectación respiratoria, o consumo de riluzole. Sin embargo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas, probablemente por el pequeño tamaño muestral en cada grupo (Yañez, 2011).

#### **4.4 Estudio de potenciales terapias sobre la citotoxicidad de LCR-ELA**

En los estudios expuestos se han ensayado diferentes sustancias que pudieran revertir las alteraciones causadas por el factor tóxico del LCR-ELA, y que pudieran por tanto ser potenciales tratamientos para la ELA. A continuación se muestra una tabla resumen de estas sustancias descritas:

## Introducción

Autor	Potencial efecto protector	No efecto sobre la toxicidad
<i>Couratier, 1993</i>	Antagonista AMPA/Kainato	Antagonista NMDA
<i>Terro, 1996</i>	Vitamina E. Alopurinol	
<i>Shahani, 2001 *</i>	Ciclofosfamida	
<i>Tikka, 2002</i>	Minociclina Antagonista NMDA y AMPA/kainato	
<i>Anneser, 2004</i>	Antagonista mGluR I	
<i>Shahani, 2004 *</i>	Deprenilo	
<i>Sen, 2005</i>	Antagonista NMDA y AMPA/kainato, con mayor efecto del último	
<i>Anneser, 2006</i>	Antagonista mGluR I	Antagonista mGluR III
<i>Shobba, 2007</i>	Inhibidor de la óxido nítrico sintetasa	
<i>Gunasekaran , 2009</i>	BDNF y CNTF	
<i>Kulshreshtha, 2011</i>	VEGF	
<i>Deepa, 2011</i>	BDNF	
<i>Yañez, 2011</i>	Resveratrol	Antagonista NMDA y AMPA/kainato Riluzole

**Tabla 6:** Efecto de sustancias sobre la toxicidad del LCR-ELA en cultivos celulares y modelo *in vivo* (Adaptado de Matías Guiu, 2010).

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## *Hipótesis y objetivos*

Recientemente el avance en el conocimiento de vías implicadas en la ELA ha sido extenso, sin embargo sigue siendo desconocido qué factor o a través de qué mecanismo media el efecto tóxico del LCR en la enfermedad, ni tampoco por qué afecta de forma específica a las motoneuronas.

Las limitaciones del modelo SOD1 para representar a los pacientes con ELA esporádica, han hecho que se cuestionen los métodos de investigación en ELA. Los modelos actuales de ELA se basan en formas genéticas, sería fundamental encontrar un modelo animal que se represente a los pacientes con ELA esporádica para un mejor entendimiento de la patogenia de la enfermedad y sobre todo para el estudio de potenciales fármacos para su tratamiento.

Basándonos en el hecho desarrollado en la introducción de que existe un efecto tóxico en el LCR de pacientes con ELA que causa neurodegeneración de las motoneuronas, nos planteamos la hipótesis de que la administración continua mediante infusión intraventricular de LCR de pacientes con ELA en ratas podría ser un modelo experimental de ELA.

Para demostrar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1- Comparar las alteraciones histológicas causadas por la infusión prolongada y continua intraventricular en ratas de LCR procedente de pacientes con ELA frente a las causadas por la infusión de LCR de humanos sin la enfermedad para comprobar el descrito efecto tóxico del LCR procedente de los pacientes con ELA.
- 2- Estudiar longitudinalmente la cronología de las alteraciones histológicas que se produzcan como consecuencia de dicha infusión.

### *Hipótesis y objetivos*

- 3- Comparar las alteraciones histológicas consecuencia de la infusión de LCR procedente de pacientes con ELA con la neuropatología descrita en ELA.
- 4- Comprobar si la infusión intraventricular prolongada y continua de LCR procedente de pacientes con ELA en ratas se comporta como un modelo de lesión de motoneuronas que pueda servir de modelo experimental de ELA humana.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



Para poder demostrar la hipótesis y cumplir los objetivos descritos, hemos establecido la siguiente metodología:

## **1. OBTENCIÓN DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO**

### **1.1 LCR-ELA**

Las muestras de LCR procedían de pacientes diagnosticados de ELA definitiva según los criterios de El Escorial-Arlie (Brooks, 2000) seguidos en la Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Hospital Clínico San Carlos. La evaluación del paciente incluía en todos los casos historia clínica, exploración física y neurológica, estudio neurofisiológico (electromiografía y electroneurografía) y analítica de sangre y LCR.

Las muestras de LCR fueron recogidas mediante punción lumbar cuando existía una indicación clínica, como parte del estudio rutinario de paciente, bajo consentimiento informado del paciente. Se obtuvo una cantidad entre 1,5 y 3cc de LCR para el estudio, siempre bajo el consentimiento informado del paciente.

Se utilizó para el experimento LCR procedente de 7 pacientes con ELA. De ellos 4 eran mujeres y 3 hombres. Había 3 casos familiares, uno de ellos asociado a SOD1 (mutación en exón 4, posición 255 G>T), otro paciente presentaba la expansión de la repetición del hexanucleótido C9orf72 recientemente descrita tanto en ELA esporádica como familiar (Majounie, 2012) y en el tercer caso los estudios genéticos realizados por el momento no han mostrado alteraciones. Los otros 4 pacientes eran casos esporádicos, en uno

### Material y métodos

de ellos se encontró una mutación N19S en el gen SOD1 (exón 1, posición 139, sustitución de aminoácido asparagina por serina) no patogénica (Vela, 2012). Tres casos eran de inicio espinal, tres casos de inicio bulbar y uno de los pacientes presentaba síntomas de ambas localizaciones. La edad media de los pacientes al momento de la extracción eran 54,2 años. Cuatro eran casos con evolución de la enfermedad igual o menor a 6 meses y tres eran casos de larga evolución, de 21, 40 y 50 meses desde el inicio de los síntomas.

Las características de los pacientes con ELA se muestran en la tabla 7.

LCR-ELA	Sexo	Edad	SALS/FALS	Forma inicio	Tiempo evolución
1	Varón	34 años	FALS-SOD1	Espinal	50 meses
2	Varón	66 años	FALS-hexanucleótido C9orf72	Bulbar y espinal	6 meses
3	Mujer	60 años	SALS	Espinal	21 meses
4	Mujer	61 años	SALS	Bulbar	5 meses
5	Mujer	57 años	FALS	Bulbar	2 meses
6	Varón	46 años	SALS	Bulbar	6 meses
7	Mujer	56 años	SALS (mutación SOD1 N19S no patogénica)	Espinal	40 meses

**Tabla 7:** Resumen de las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con ELA de los que se obtuvo LCR para el estudio.

## 1.2 LCR-Control

Se utilizaron como controles muestras de LCR procedentes de pacientes mayores de 18 años seguidos en el Servicio de Neurología del Hospital Clínico San Carlos, con alguna patología no neurodegenerativa ni infecciosa, que habían requerido de la realización de una punción lumbar por motivo de su examen rutinario, por ejemplo para estudio de cefalea, o punciones evacuadoras en hipertensión intracraneal idiopática. También se realizó bajo consentimiento informado del paciente. En todos los casos el estudio de LCR fue normal.

Las características de los pacientes control se muestran en la tabla 8.

LCR-Control	Sexo	Edad	Motivo de extracción de LCR
1	Mujer	41 años	Hidrocefalia normotensiva
2	Varón	40 años	Cefalea
3	Varón	85 años	Cefalea
4	Mujer	27 años	Cefalea
5	Mujer	39 años	Hipertensión intracraneal idiopática
6	Mujer	25 años	Hipertensión intracraneal idiopática
7	Varón	21 años	Estudio tras crisis epiléptica

**Tabla 8:** Resumen de las características epidemiológicas y clínicas de los controles de los que se obtuvo LCR para el estudio.

### **1.3 Conservación de las muestras**

Las muestras de LCR se centrifugaban a 1500 rpm durante 10 minutos para retirar las posibles células presentes en el LCR y se distribuían en alícuotas de 900 microlitros ( $\mu$ l) que fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **2. EXPERIMENTOS *IN VIVO***

### **2.1 Animales**

Se utilizaron 28 ratas Wistar macho (Charles River Laboratory) con edad comprendida entre 1 y 5 meses al momento de la implantación de la bomba osmótica (media de edad 3,6 meses).

Los animales fueron estabulados en jaulas individuales en el animalario del Hospital Clínico San Carlos. Tuvieron acceso a comida (piensos comerciales) y agua *ad libitum*, siguiendo un ciclo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, en condiciones de temperatura y humedad adecuadas.

Los animales fueron manipulados en todo momento siguiendo los principios de cuidados de animales de laboratorio publicados por el Comité Ético Español (RD 1201/2005) y las directrices de la Normativa de la Unión Europea (86/609/EEC). El estudio fue aceptado por el Comité de investigación y el comité de ética animal del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

## 2.2 Grupos experimentales

Se diseñaron 3 grupos experimentales para el estudio:

- Grupo 1: 9 ratas con bomba osmótica con LCR-control
- Grupo 2: 15 ratas con bomba osmótica con LCR-ELA
- Grupo 3: 4 ratas con bomba osmótica con suero salino fisiológico 0,9% (SSF)

En cada uno de los grupos experimentales, el tiempo de observación de las ratas fue de 20, 45 y 82 días, tal y como se resume en la siguiente tabla:

Tiempo de observación	20 días	45 días	82 días
<b>Grupo 1 LCR-control</b>	1 rata	7 ratas	1 rata
<b>Grupo 2 LCR-ELA</b>	2 ratas	7 ratas	6 ratas
<b>Grupo 3 SSF</b>	1 rata	2 ratas	1 rata

**Tabla 9:** Tiempo de observación de las ratas en cada uno de los grupos experimentales.

## 2.3 Administración de LCR

El LCR era inyectado intratecalmente en el ventrículo lateral derecho de la rata mediante una minibomba osmótica (Alzet 2006, Alzet Palo Alto, CA, USA) de forma continua a una velocidad de flujo de 0,15  $\mu\text{l/hora}$ . Antes de la implantación, la minibomba osmótica se llenaba con 200  $\mu\text{l}$  de LCR-ELA, LCR-control o SSF, según el grupo experimental. (Figura 2)

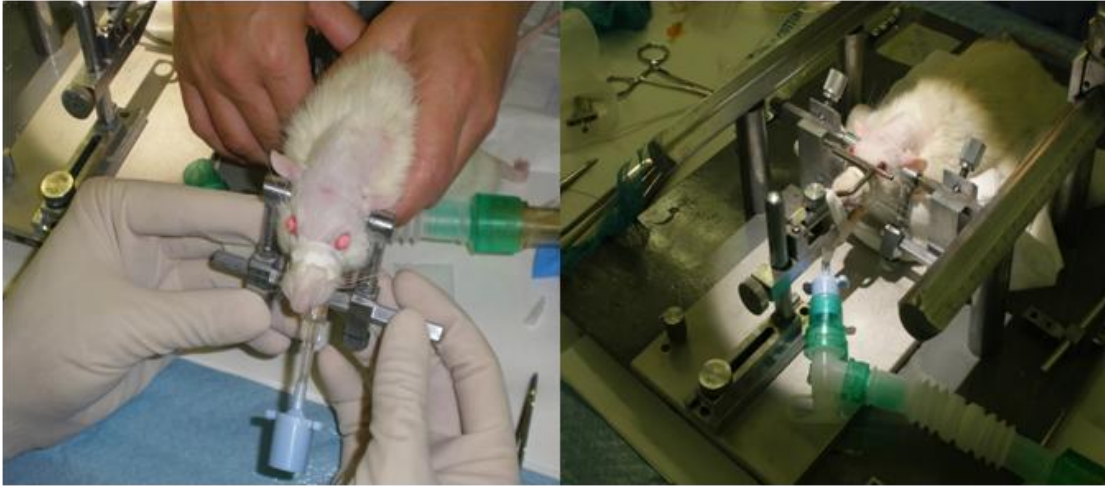


**Figura 2:** Imagen que muestra cómo se llena la minibomba con LCR.

El volumen de la bomba aseguraba la infusión durante un periodo de 42 días. En aquellos animales en los que la bomba se mantuvo más tiempo, se procedió a sellar mecánicamente el tubo de polietileno, para evitar efectos de irritación local.

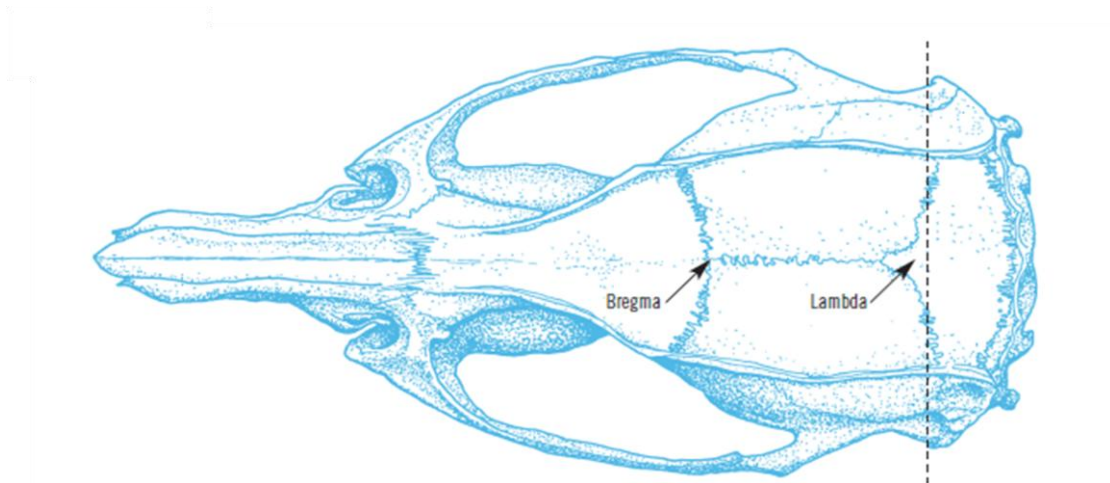
#### **2.4 Cirugía para implantación de bomba osmótica de LCR**

Tras la inducción de anestesia general utilizando una mezcla de fentanilo 0,3mg/kg, medetomidina 0,3mg/kg e intubación orotraqueal con administración de isoflurano 2% para mantenimiento de anestesia, se colocó a cada rata sobre el marco de estereotaxia fijándole la cabeza en tres puntos: ambos conductos auditivos internos y los dientes incisivos. (Figura 3)



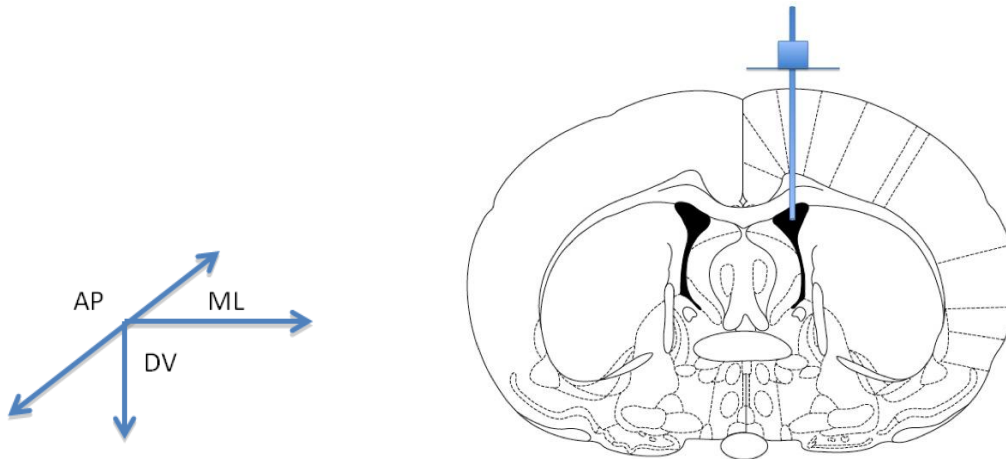
**Figura 3:** Rata situada en marco de estereotaxia fijada en ambos conductos auditivos y dientes incisivos.

Se practicó una incisión longitudinal sobre la calota y se disecó hasta exponer la tabla externa. En primer lugar se localizaba el punto bregma para mediante coordenadas estereotáficas localizar el ventrículo lateral de la rata. (Figura 4)



**Figura 4:** Visión dorsal de la calota de una rata Wistar, se muestra la posición de bregma y lambda (Tomado de Paxinos & Watson, 2007).

Basándonos en Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 2007), las coordenadas para el ventrículo lateral desde el punto bregma fueron (-0.5mm anteroposterior, -1,4 mm lateral y 3,3 mm dorsoventral. (Figura 5)



**Figura 5:** Coordenadas de estereotaxia para el ventrículo lateral (Tomado y adaptado de Paxinos & Watson, 2007).

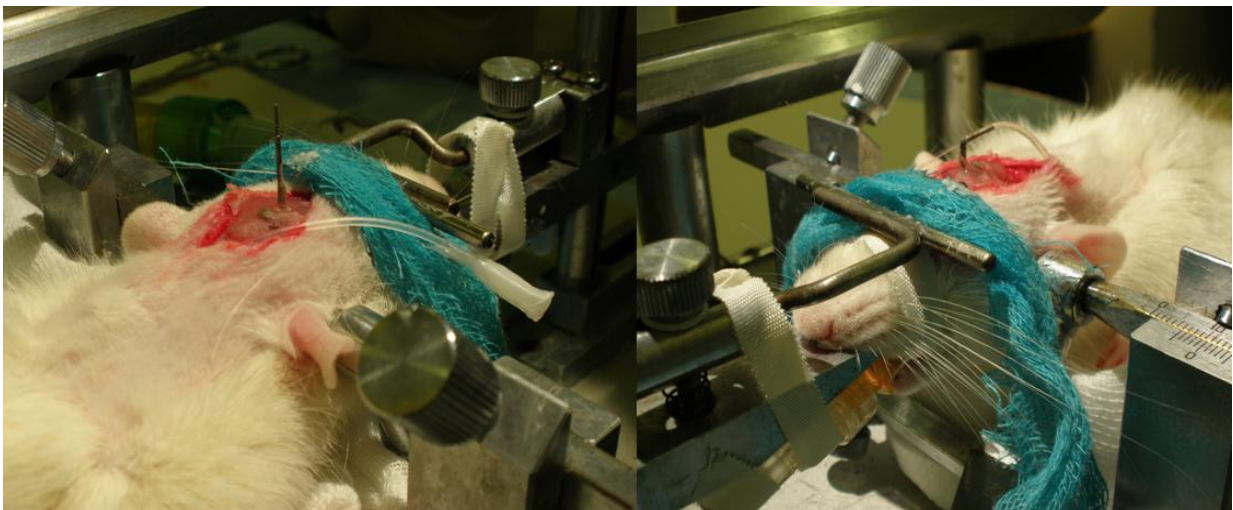
Con un taladro de diamante, se realizó un agujero de trépano de aproximadamente 1,5mm de diámetro. Utilizando la guía estereotáctica se insertó un catéter metálico (calibre 21G) coincidiendo con el ventrículo lateral derecho de la ratona (Figura 6). Cada catéter se fijó al cráneo con cemento dental y se amoldó a la curvatura craneal.

A continuación, se disecó una bolsa subcutánea en el dorso de la ratona, entre las escápulas y se introdujo la bomba osmótica con LCR control, LCR-ELA o SSF (elegido de manera aleatoria).



**Figura 6:** Imagen que muestra la colocación del catéter mediante guía estereotáxica.

La minibomba se conectó a la cánula de infusión del ventrículo lateral mediante un tubo de polietileno de 10 cm. (Figura 7) Se fijó con cianoacrilato y cemento dental. Se dieron puntos de sutura en la piel en monoplano con seda 2-0 en puntos discontinuos.



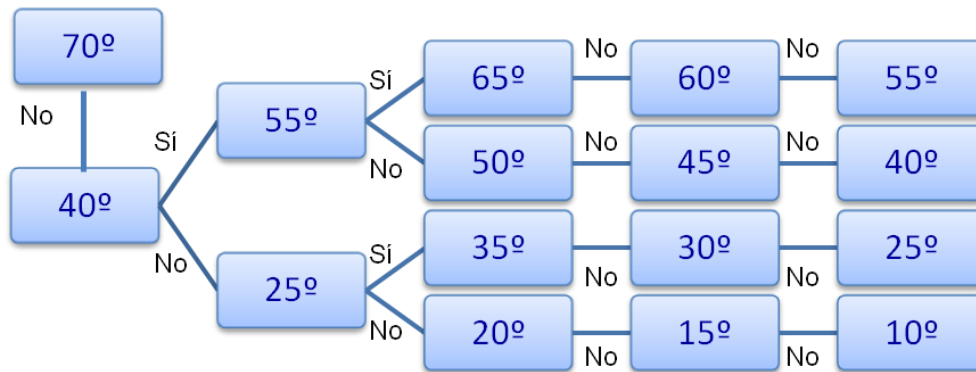
**Figura 7:** Se puede observar la cánula en el ventrículo lateral y el tubo de polietileno que conecta la minibomba con la cánula ventricular.

## **2.5 Variables clínicas exploradas**

Los animales se pesaron cada dos semanas en una balanza digital. Transcurrida una semana desde la intervención quirúrgica, se exploró a los animales al menos una vez a la semana, evaluando la función motora de las ratas mediante el test del plano inclinado y la escala motora de Matsumoto. Para mantener el ciego, durante la exploración se desconocía a qué grupo experimental pertenecía la rata.

- *Plano inclinado*

Este test fue desarrollado para la evaluar la función motora de un modelo de lesión de médula espinal. La rata se coloca lateralmente, perpendicular al eje mayor del plano inclinado, y se mide el ángulo máximo en el que pueden mantener su posición sin caerse durante 5 segundos (Figuras 8 y 9). Para evaluar la fuerza de las 4 extremidades de igual forma, en primer lugar se coloca al animal con las extremidades derechas hacia abajo, y después con las extremidades izquierdas hacia abajo (Rivlin, 1977). Una puntuación menor de 70° se correlacionaba con el inicio de la debilidad muscular en el modelo transgénico SOD1 G93A en ratas (Matsumoto, 2006).



**Figura 8:** Algoritmo que seguimos para la evaluación en plano inclinado. Se toma como valor final el máximo grado de inclinación en el que aguante 5 segundos sin caer (Matsumoto, 2006).

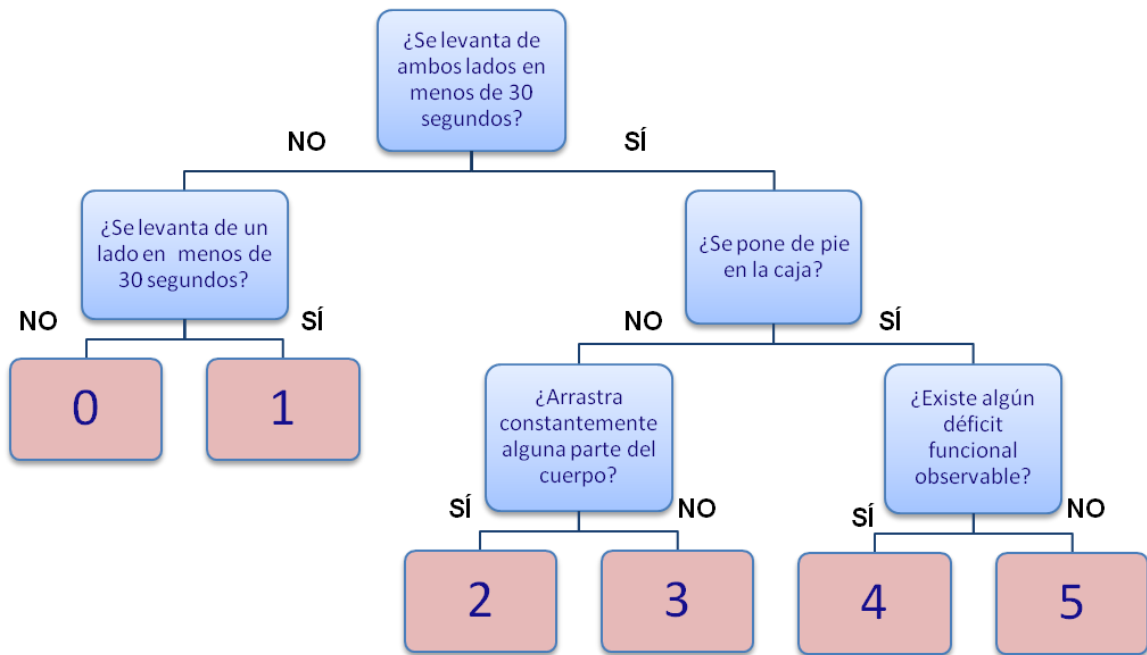


**Figura 9:** Imagen que muestra la evaluación de una de las ratas en el plano inclinado.

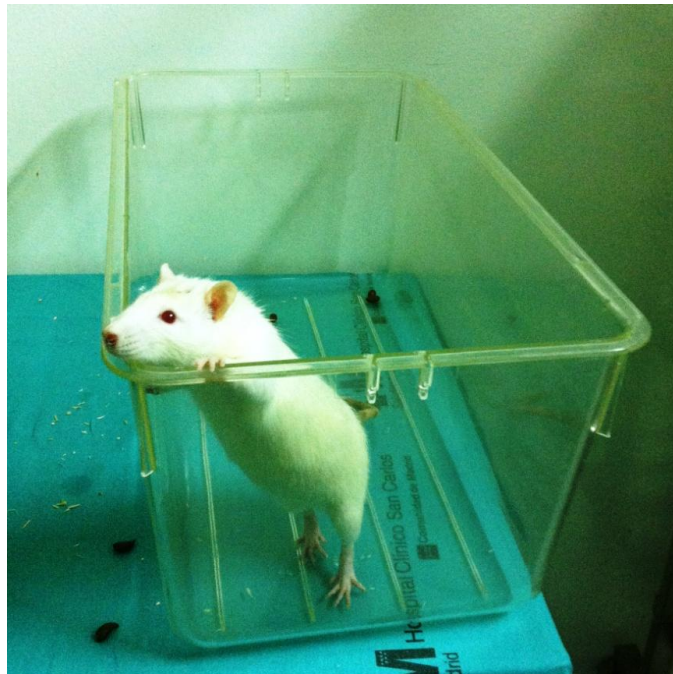
- *Escala motora de Matsumoto*

Es un sistema de evaluación que se correlaciona bien con la pérdida de motoneuronas espinales en el modelo SOD1 G93A en ratas. Una puntuación de 5 es una rata normal y una puntuación de 0 es una rata totalmente parética. En primer lugar se evalúa la capacidad de la rata para levantarse desde cada uno de los lados, si no puede levantarse desde ningún lado en menos de 30 segundos se le da una puntuación de 0, si lo hace desde un lado la puntuación será 1. Con las ratas que podían levantarse de ambos lados se evaluaba la capacidad de ponerse de pie en una caja espontáneamente observándolas durante un minuto. Si se movían poco en su caja, se transferían a una nueva y posteriormente de nuevo a la suya para estimular la exploración. También se estimulaba la exploración golpeando ligeramente la caja. Las ratas que no se ponían de pie eran observadas en campo abierto, si arrastraban constantemente alguna parte del cuerpo (excepto la cola y el escroto) la puntuación era 2, si podían levantar cada parte en algún momento la puntuación era 3. Las ratas que se ponían de pie en la caja eran observadas buscando algún déficit funcional evidente, por ejemplo parálisis de una extremidad, en tal caso la puntuación era 4, y si la rata era normal 5 (Figuras 10 y 11) (Matsumoto, 2006).

## Material y métodos



**Figura 10:** Escala de Matsumoto (Adaptada de Matsumoto, 2006).



**Figura 11:** Imagen que muestra la evaluación de la escala de Matsumoto, en este caso sería de 5 puntos ya que se pone de pie en la caja y no existe ningún déficit observable.

## **2.6 Variables neurofisiológicas**

Se realizó un electromiograma a todas las ratas antes del sacrificio. Para mantener el ciego, el electromiografista desconocía a qué grupo experimental pertenecía cada rata. Las ratas eran sedadas con isoflurano a 1,5% en 0,7 litros/minuto de oxígeno durante el procedimiento para poder evaluar la presencia de actividad motora espontánea estando la rata en reposo.

La aguja se insertaba en ambas extremidades anteriores, ambas extremidades posteriores y músculos paravertebrales de ambos lados (Figura 12). La localización intramuscular del electrodo de aguja se confirmaba por la presencia de actividad muscular de inserción al mover el electrodo. Se descartaron artefactos procedentes de ruido de placa motora, latido cardiaco y, en región paravertebral, actividad de la musculatura respiratoria. Se evaluó la presencia de actividad motora espontánea: ondas positivas, fibrilaciones o fasciculaciones.

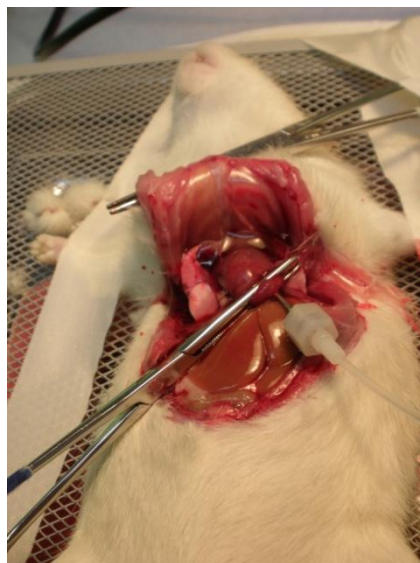


**Figura 12:** Imagen que muestra la técnica de realización del electromiograma.

## **2.7 Sacrificio del animal**

Para ver la evolución de los posibles cambios neuropatológicos a lo largo del tiempo se sacrificaron ratas de cada grupo en tres momentos diferentes: a los 20 días, a los 45 días y a los 82 días tras la cirugía, como se resumió anteriormente en la Tabla 9.

Los animales eran profundamente anestesiados mediante una inyección intraperitoneal con una dosis de pentobarbital de 60mg/kg y fentanilo 0,3mg/kg como analgesia. Se proseguía con el sacrificio y fijación de estructuras del animal mediante perfusión transcardiaca. Para ello se realizó una toracotomía con colocación del catéter en el ventrículo izquierdo, y se administraba suero salino fisiológico al 0,9%, de esta manera se arrastra la sangre del lecho vascular. Una vez que el flujo que sale por la aurícula derecha tiene aspecto transparente, se comienza con la solución fijadora, en este caso una mezcla de paraformaldehído al 4% y tampón fosfato 0,1 M. (Figura 13)



**Figura 13:** Imagen que muestra la técnica de perfusión transcardiaca para fijación de estructuras.

Una vez fijado, se extrajeron los cerebros y médulas espinales de los animales, se lavaron con tampón fostafo 0,1M y se crioprotegieron mediante inmersión en sacarosa 30% y en medio OCT (*Optimal Cutting Temperature*). El material se conservó a -80°C hasta su uso.

El sacrificio del animal se realizó siguiendo los principios de cuidados de animales de laboratorio publicados por el Comité Ético Español (RD 1201/2005) y las directrices de la Normativa de la Unión Europea (86/609/EEC).

### **3 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO**

Se realizaron secciones coronales de 40 µm de grosor de segmentos espinales C5-C6 y L3-L5 y de corteza motora. Para ello se utilizó un criostato (Microm) y se colocaron las secciones en una solución de criopreservación para tejido cerebral compuesta de etilenglicol y dimetil sulfóxido.

#### **3.1 Técnicas de inmunofluorescencia**

Para las técnicas de inmunofluorescencia en primer lugar se lavaron las secciones con tampón PBS, se permeabilizaron con Triton x-100 al 0,1% en PBS 0,1M y se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente para evitar las uniones inespecíficas.

A continuación se incubaron los cortes con el anticuerpo primario correspondiente durante toda una noche a una temperatura de 4°C. (Tabla 10)

Descripción de los anticuerpos primarios utilizados:

- **Anti-IBA-1** (1:1000, Wako, 019-19741): Proteína de unión a calcio que se expresa de forma específica en células de microglía y que está sobreexpresada durante la activación de estas células.
- **Anti-MHC-II** (1:500, Abcam 6403): Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II. Glicoproteína de membrana plasmática implicada en la presentación de antígenos a los linfocitos T.
- **Anti-GFAP** (1:600, Millipore, MAB360): Proteína ácida gliofibrilar, proteína de los filamentos intermedios de astrocitos, su expresión aumenta con la activación astrocitaria
- **Anti-S100β** (1:200, Millipore, 04-1054): proteína de unión a calcio que se expresa en los astrocitos.
- **Anti-GLT-1** (1:200, Millipore, AB1783): Transportador de glutamato de las células gliales encargado de la recaptación de glutamato de la sinapsis.
- **Anti-Caspasa 3** (1:200, Millipore, 04-1090): Caspasa efectora de la apoptosis, común a las vías extrínseca e intrínseca.
- **Anti-Akt Pan** (1:100, Cell signaling 2920S) y **Anti-Akt Phos** (1:100, Cell signaling 4060S): Protein-kinasa implicada en la supervivencia celular, por inhibición de vías apoptóticas, la forma activa es la fosforilada.

- **Anti-TARDBP** (1:200, Abcam, 42474): TDP-43, ribonucleoproteína presente en las inclusiones de pacientes con ELA esporádica y familiar no asociada a SOD1.
- **Anti-Ubiquitina** (1:100, Abcam, 7780): Proteína que marca a otras proteínas para dirigirlas al proteasoma para su destrucción.
- **Anti-Periferina** (1:200, Millipore, AB9282): Proteína de filamentos intermedios que se expresa en neuronas, que juega un importante papel en el transporte axonal en las motoneuronas y está presente en los cuerpos de Bunina típicos de la histopatología de la ELA esporádica. (Mizuno, 2011)
- **Anti-Transferrina** (1:200, Abcam 22391): glicoproteína plasmática de unión a hierro, presente en los cuerpos de Bunina típicos de la histopatología de la ELA esporádica (Mizuno, 2006).
- **Anti-Cistatina C** (1:100, Abcam 68290): proteína inhibidora de cisteín-proteasas lisosomales, presente en los cuerpos de Bunina típicos de la histopatología de la ELA esporádica. (Okamoto, 2008 )
- **Anti-Metalotioneína** (1:100, Abcam 12228, marca MT-I y MT-II): Proteína con capacidad de unirse a metales pesados como Zinc y Cobre, implicada en la protección contra la toxicidad de metales y contra el estrés oxidativo.
- **Anti-Colin acetiltransferasa (ChAT)** (1:100, Abcam 68779): Enzima sintetizada en el soma neuronal, cuya función es unir acetil-coenzima A a la colina, dando lugar al neurotransmisor acetilcolina. Sirve para identificar neuronas.

## Material y métodos

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones se lavaron con PBS tres veces para eliminar el exceso de anticuerpo primario restante y después se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario específico para cada anticuerpo primario (ratón, rata, conejo o cabra), acoplado a fluoróforos como Cy3-(1:1000, Jackson) o Alexa Fluor 488, 555 o 647 (1:500, Invitrogen). Todos los anticuerpos se diluyeron con PBS.

Anticuerpos primarios	Dilución	Casa comercial
Anti-IBA-1	1:1000	Wako, 019-19741
Anti-MHC II	1:500	Abcam 6403
Anti-GFAP	1:600	Millipore, MAB360
Anti-S100 beta	1:200	Millipore, 04-1054
Anti GLT-1	1:200	Millipore, AB1783
Anti-caspasa3	1:200	Millipore, 04-1090
Anti-AKT Phos	1:100	Cell signaling 4060S
Anti-AKT Pan	1:100	Cell signaling 2920S
Anti-TARDBP	1:200	Abcam, 42474
Anti-ubiquitina	1:100	Abcam, 7780
Anti-periferina	1:200	Millipore, AB9282
Anti-Transferrina	1:200	Abcam 22391
Anti-cistatina C	1:100	Abcam 68290
Anti-Metalotioneína	1:100	Abcam 12228
Anti-Colin acetiltransferasa	1:100	Abcam 68779
Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa comercial
Cy3	1:1000	Jackson
Alexa Fluor 488, 555, 647	1:500	Invitrogen

**Tabla 10:** Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Las secciones fueron lavadas en PBS tres veces, y se contratiñeron con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol 1 µg/ml, Sigma-Aldrich), un marcador de los núcleos celulares en dilución 1:1000 durante 10 min.

Fueron montados sobre portas gelatinizados y se cubrieron con el medio de montaje acuoso FluorSave (Calbiochem) adecuado para la fluorescencia. Se realizaron tres replicas por marcador.

### **3.2 Análisis y cuantificación de la inmunofluorescencia**

Las imágenes de inmunofluorescencia se obtuvieron con un microscopio confocal Olympus AF1000.

Para los marcadores GFAP, IBA1, caspasa 3 y MHCII se obtuvieron imágenes de microscopía confocal mediante el programa Olympus Confocal (Olympus FluoView FV1000) utilizando los objetivos de aceite de inmersión 20x o 40x. Se utilizó el láser adecuado para cada una de las ondas de excitación de los fluorocromos utilizados (Alexa Fluor 488, 555, 647, Cy3 y diodo azul para el DAPI). La inmunorreactividad de los anticuerpos utilizados se cuantificó mediante el uso del programa de análisis ImageJ versión 1.42q (USA) . El número de células inmunorreactivas se estableció mediante el conteo de células positivas en un área de 368 µm<sup>2</sup> escogida al azar de cada sección, utilizando tres o cuatro secciones diferentes de cada una de las zonas estudiadas (corteza motora, tálamo, médula cervical y lumbar).

Para los marcadores ubiquitina, cistatina C, TDP43 y transferrina se realizó un análisis cualitativo expresando los resultados en densidad de células inmunorreactivas por área de 736mm<sup>2</sup>.

Para los marcadores periferina, S100β, GLT-1, AKT pan, AKT phos y metalotioneina, se utilizó una modificación al método del disector óptico descrito por Reed, usando el principio imparcial del disector tridimensional (Reed, 1998). Se llevó a cabo el análisis mediante medidas de densidad óptica (proceso de imagen binaria de blanco y negro), obteniendo el porcentaje de células positivas por campo analizado. Se seleccionaron al azar 8 áreas por cada animal. Para este procedimiento se utilizó el programa ImageJ versión 1.42 (USA).

Se analizaron los cambios en los marcadores inmunohistoquímicos en los diferentes momentos del sacrificio en las ratas con LCR-ELA y se compararon con los grupos control.

#### **4 DETERMINACIÓN DE ZINC EN TEJIDO**

Se seleccionaron 8 ratas con LCR-ELA, 2 ratas con LCR-control y una rata sin manipular en las que se realizó un análisis del zinc en las secciones de corteza motora y de médula espinal mediante espectrometría de absorción atómica de llama.

Las muestras fueron inicialmente liofilizadas, se pesó el tejido seco en una balanza de precisión y a continuación se trató con 200 µl de ácido nítrico

suprapur al 65% (Merck) a 80°C durante 5 horas para la digestión del tejido. Transcurrido ese tiempo las muestras se enfriaron y se diluyeron con agua destilada hasta un volumen final de 2ml.

Para la determinación de zinc se utilizó un espectrómetro de absorción atómica AAnalyst 200 de Perkin-Elmer, con una lámpara de cátodo hueco de zinc (Perkin Elmer) con una intensidad de 15mAmp. Se utilizaron estándares de zinc (Perkin Elmer N9300168) a concentraciones de 200µg/dl, 100µg/dl y 50µg/dl. Para comprobar la reproducibilidad y precisión de las medidas en cada serie de muestras se evaluaron controles de calidad (Seronorm® Trace Elements niveles 1 y 2).

La lectura obtenida en el equipo tras realizar la curva de calibración estaba expresada en µg/dl, para obtener el resultado en µg/g de tejido seco se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{g/dL} \times 2\text{mL}}{100 \times \text{g de tejido}} = \mu\text{g/g de tejido seco}$$

## **5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el análisis estadístico, se procesaron los datos utilizando el programa GraphPadPrism.

Se expresan los resultados obtenidos como media ± desviación estándar.

## **IV. RESULTADOS**



## **1. VARIABLES CLÍNICAS Y NEUROFISIOLÓGICAS**

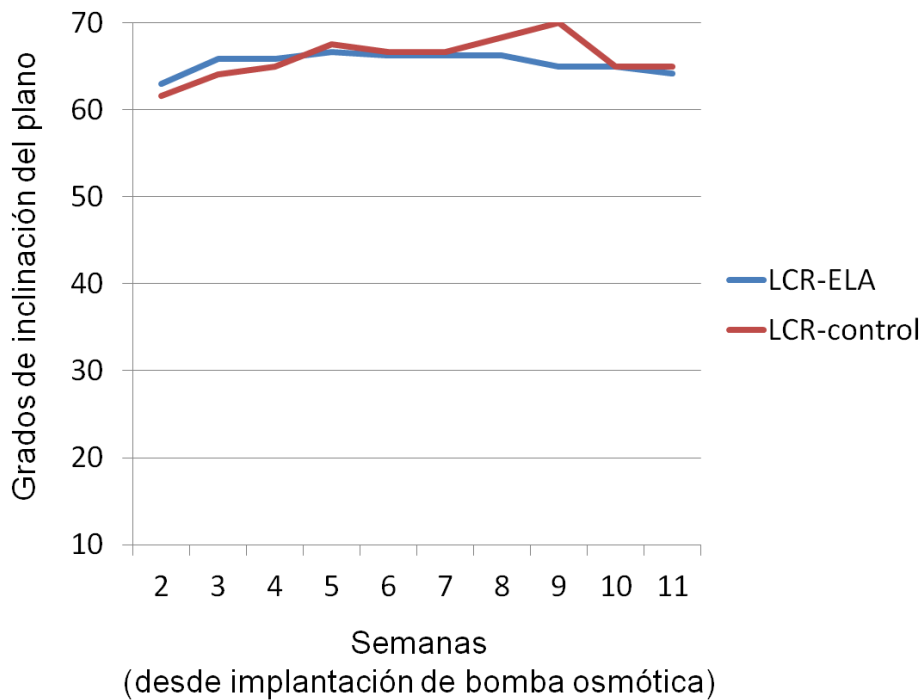
Como consecuencia de la intervención quirúrgica para la implantación de la bomba osmótica, dos ratas murieron. La primera pertenecía al grupo LCR-control de 45 días y presentó una parada cardiorespiratoria durante la cirugía. La segunda pertenecía al grupo LCR-ELA de 45 días y apareció muerta el quinto día tras la cirugía probablemente por alguna complicación relacionada con el procedimiento. Las otras 26 ratas sobrevivieron hasta el momento del sacrificio programado y no mostraron datos de infección en la zona del implante, tampoco presentaron crisis epilépticas ni ninguna otra complicación.

En cuanto a las variables clínicas, peso, plano inclinado y escala motora de Matsumoto, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos LCR-control y LCR-ELA (Tabla 11). La puntuación en el plano inclinado no presentó variaciones significativas a lo largo de la observación, manteniéndose entre un mínimo de 60° de inclinación y un máximo de 70° en los tres grupos experimentales, sin encontrar diferencias significativas entre los grupos (Figura 14). En todas las evaluaciones de todos los animales la puntuación en escala motora de Matsumoto siempre fue 5 ya que no se observaron déficits funcionales. Tampoco se encontraron diferencias significativas en las variaciones de peso de las ratas desde el inicio de la administración de LCR hasta el momento de sacrificio.

Resultados

Grupo experimental	Peso	Plano inclinado	Matsumoto	EMG
LCR-control	NS	NS	5	Normal
SSF	NS	NS	5	Normal
LCR-ELA				
20 días	NS	NS	5	Normal
45 días	NS	NS	5	Normal
82 días	NS	NS	5	Ondas positivas 4 ratas

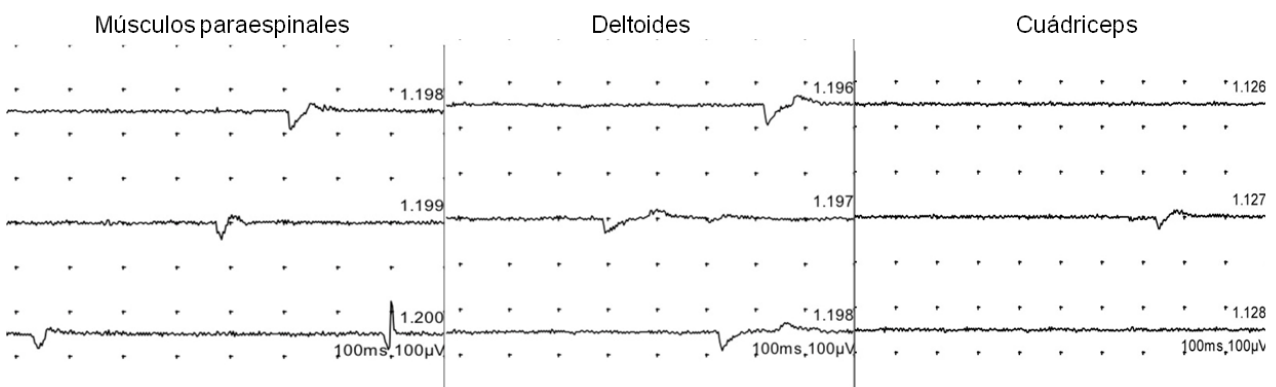
**Tabla 11:** Las variables clínicas estudiadas en los tres grupos experimentales no mostraron alteraciones. El estudio electromiográfico mostró ondas positivas en el grupo LCR-ELA sacrificado a los 82 días. (NS: No significativo)



**Figura 14:** Resultados de las evaluaciones en el plano inclinado a lo largo del tiempo de observación desde la implantación de la bomba osmótica. Se expresa la media de cada grupo en cada semana de evaluación. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

## Resultados

En los estudios de electromiografía, se encontraron ondas positivas (Figura 15) en extremidades anteriores, posteriores y músculos paravertebrales, en el electromiograma realizado un día antes del sacrificio en 4 ratas del grupo LCR-ELA sacrificado a los 82 días post-implantación de la bomba osmótica.



**Figura 15:** Electromiograma de una de las ratas del grupo LCR-ELA sacrificado a los 82 días, realizado un día antes del sacrificio. Se observan ondas positivas en músculos paravertebrales, deltoides y cuádriceps.

## 2. ESTUDIO NEUROPATOLÓGICO

Como consecuencia de la intervención quirúrgica en los animales sacrificados a los 20 días post-implantación de los tres grupos experimentales se observó una astrogliosis reactiva y activación microglial en la corteza motora, así como un ligero aumento de caspasa 3 comparado con animales no manipulados.

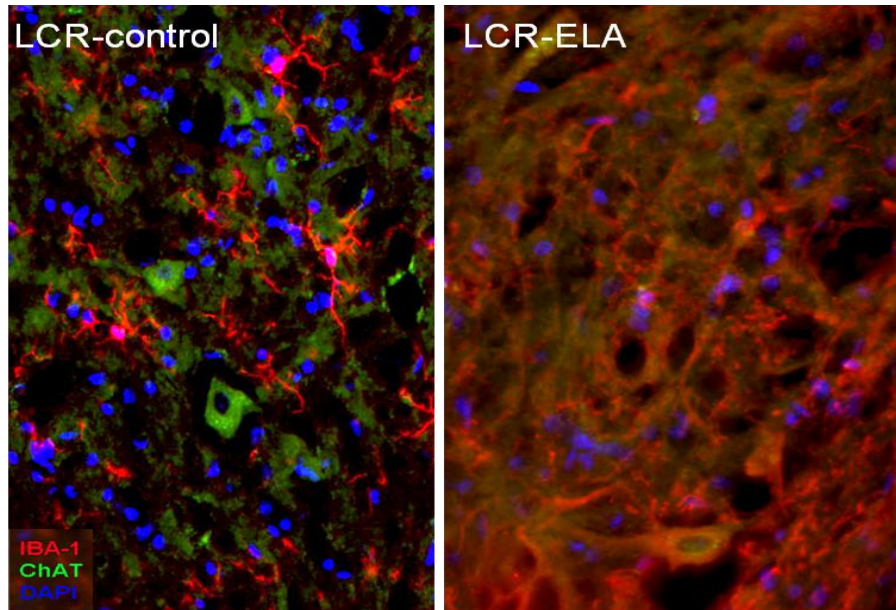
Además se encontraron una serie de alteraciones histológicas en las ratas tratadas con LCR procedente de pacientes con ELA no presentes en el grupo LCR-control ni en el grupo SSF que describimos a continuación:

### 2.1 Activación microglial: expresión de IBA-1 y MHC-II

Al observar las secciones marcadas con **IBA-1**, marcador que se sobreexpresa en células de microglía activadas, a los 20 días se empieza a ver un discreto aumento de expresión en corteza motora que podría ser atribuible a la intervención quirúrgica, pero también se observa en médula lumbar. La sobreexpresión de IBA-1 se hace evidente a los 45 días post-implantación en todos los segmentos estudiados, en el grupo con LCR-ELA, indicando una respuesta de las células de microglía. (Tabla 12 y Figura 16)

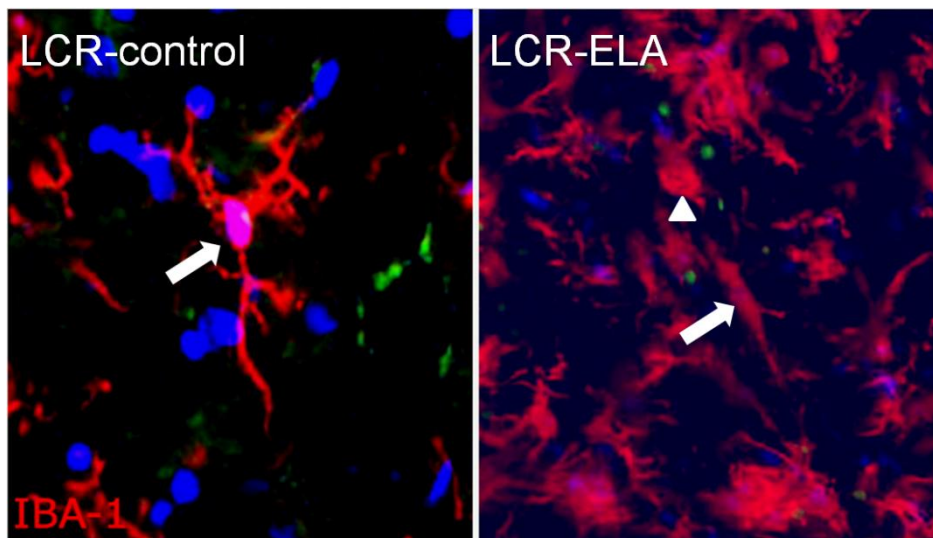
IBA-1: 20 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	14 ± 3,43	14 ± 3,9	12 ± 3,2
LCR-control	17 ± 1,5	18 ± 1,9	15 ± 2,6
LCR-ELA	22 ± 2,0*	22 ± 4,2	23 ± 2,3*
IBA-1: 45 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	15 ± 3,5	9 ± 2,8	12 ± 2,3
LCR-control	16 ± 2,6	12 ± 0,9	15 ± 2,6
LCR-ELA	25 ± 1,2*	24 ± 1,0*	22 ± 1,1*
IBA-1: 82 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	16 ± 1,8	12 ± 3,77	12 ± 2,5
LCR-control	19 ± 2,1	16 ± 1,2	17 ± 2,3
LCR-ELA	22 ± 1,6*	21 ± 2,6*	24 ± 2,7*

**Tabla 12:** Expresión de IBA-1 en los tres grupos experimentales a los 20, 45 y 82 días, resultados expresados en células inmunorreactivas por área. (\* p<0,05)



**Figura 16:** Con el marcador IBA-1 se observa a los 45 días una activación microglial en las secciones de las ratas tratadas con LCR-ELA.

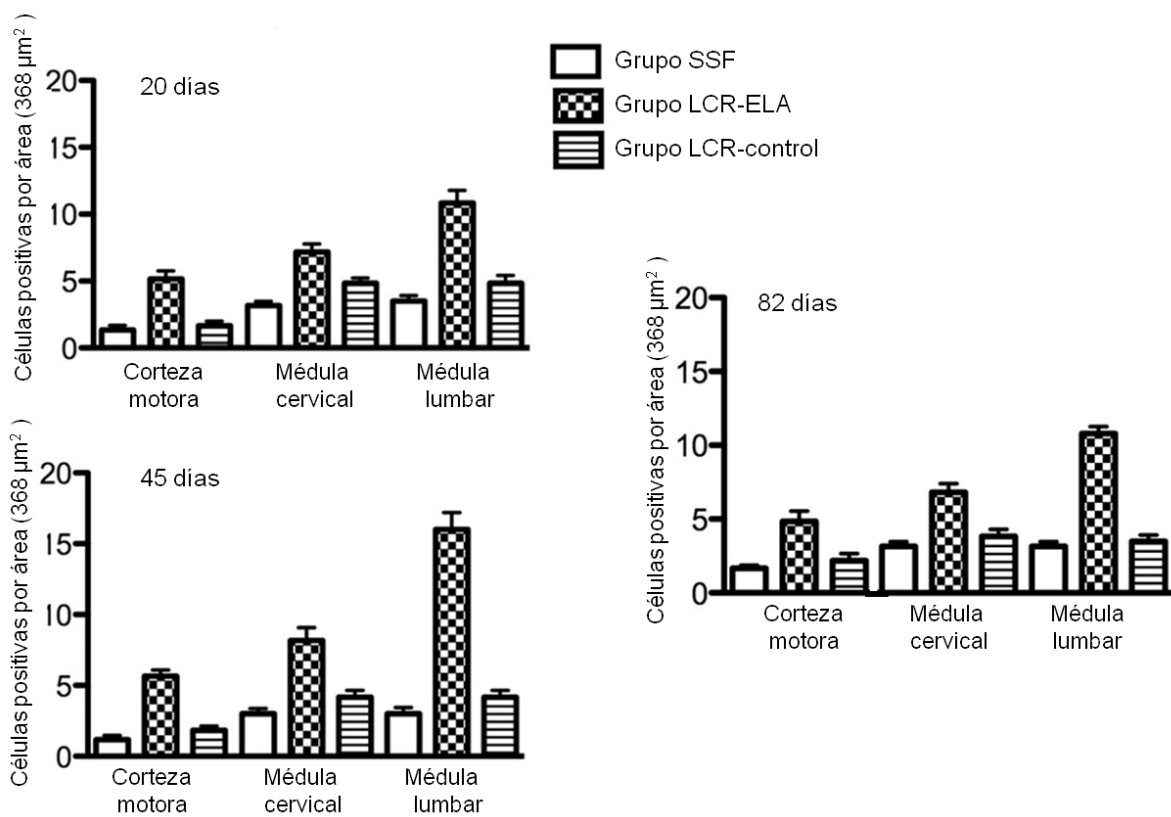
Además, en los días 45 y 82 post-implantación en el grupo LCR-ELA, las células microgliales presentaban cambios morfológicos, pasando de un estado basal en reposo ramificado con un pequeño cuerpo celular con finas prolongaciones, a un estado activado con un aspecto ameboide con un cuerpo celular redondeado con cortas y gruesas prolongaciones (Figura 17).



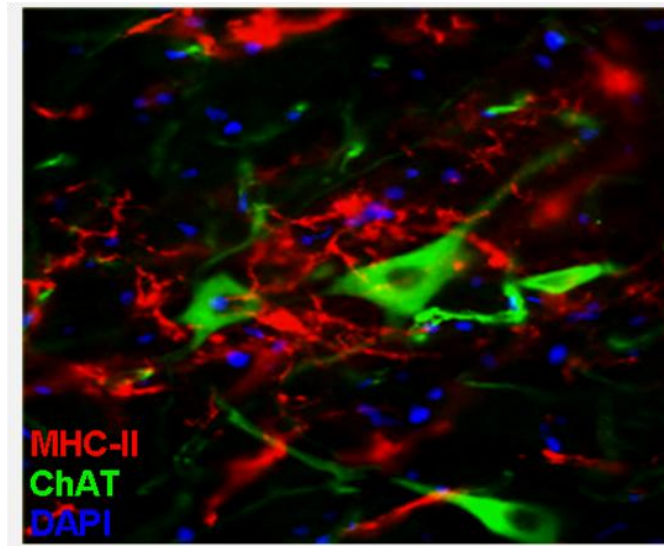
**Figura 17:** Imagen que muestra los cambios morfológicos de la microglía en el grupo LCR-ELA, pasando de un estado ramificado en reposo a un estado ameboide activado

## Resultados

Asimismo, se observa que estas células microgliales expresan **MHC-II**, marcador que indica un estado inflamatorio y se sitúan en estrecho contacto con las motoneuronas en los segmentos espinales del grupo LCR-ELA (Figura 19). La expresión de MHC-II en el grupo LCR-ELA es significativamente mayor en todos los momentos estudiados y en todos los segmentos estudiados, sobre todo en las secciones de médula lumbar. Se observa ya de forma discreta pero significativa en el día 20 post-implantación, y se hace especialmente evidente a los 45 días post-implantación. También se observa en el día 82 con menor intensidad. En los grupos con LCR-control y SSF, la expresión de MHC-II era tres veces menor que en el grupo LCR-ELA en el día 45. (Figura 18)



**Figura 18:** Nivel de expresión de MHC-II en los diferentes grupos experimentales. La expresión de MHC-II es significativamente mayor en el grupo LCR-ELA en todos los segmentos, en todos los momentos estudiados.

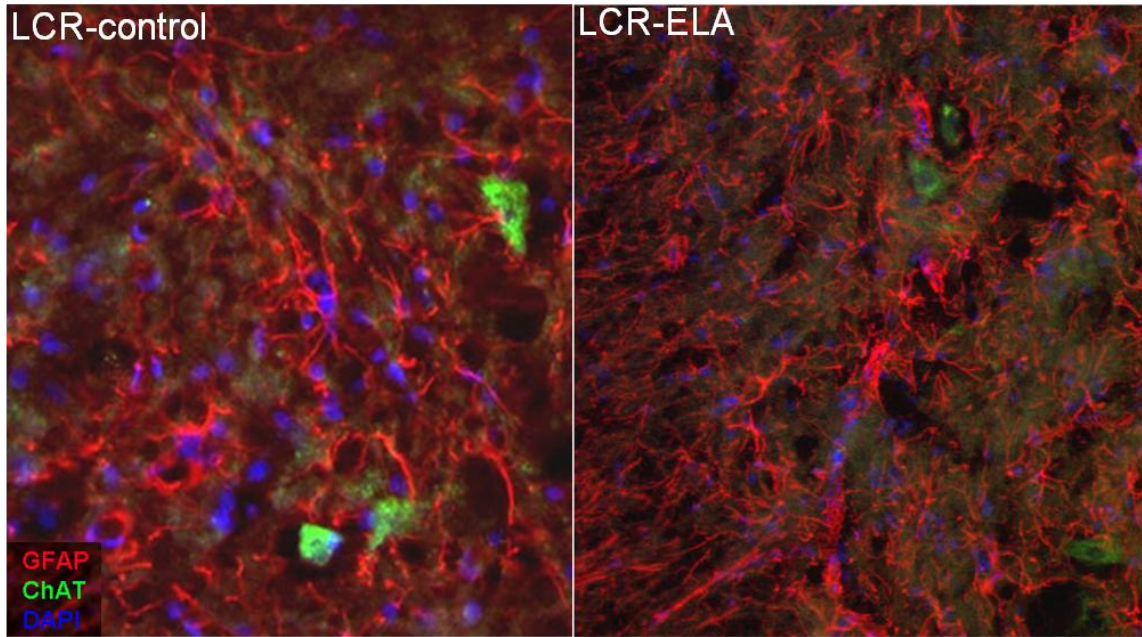


**Figura 19:** Imagen de inmunofluorescencia en una sección de médula lumbar del grupo LCR-ELA representativa de la expresión de MHC-II en las células microgliales que rodean a las motoneuronas (marcadas con ChAT).

## 2.2 Respuesta astrocitaria: expresión de GFAP, GLT-1 y S100 $\beta$

En el grupo LCR-ELA, se comienza a observar una discreta sobreexpresión de **GFAP** indicativa de activación astrocitaria en médula lumbar el día 20, observando un evidente aumento de la actividad de los astrocitos en todos los segmentos estudiados a los 45 y 82 días post-implantación. En los grupos LCR-control y SSF, la expresión de GFAP era menor en todos los momentos estudiados. (Tabla 13)

Se observan astrocitos hipertróficos que sobreexpresan GFAP situados en la vecindad de las motoneuronas tanto a nivel cortical como medular. Esta activación es especialmente evidente a los 45 días post-implantación. (Figura 20)



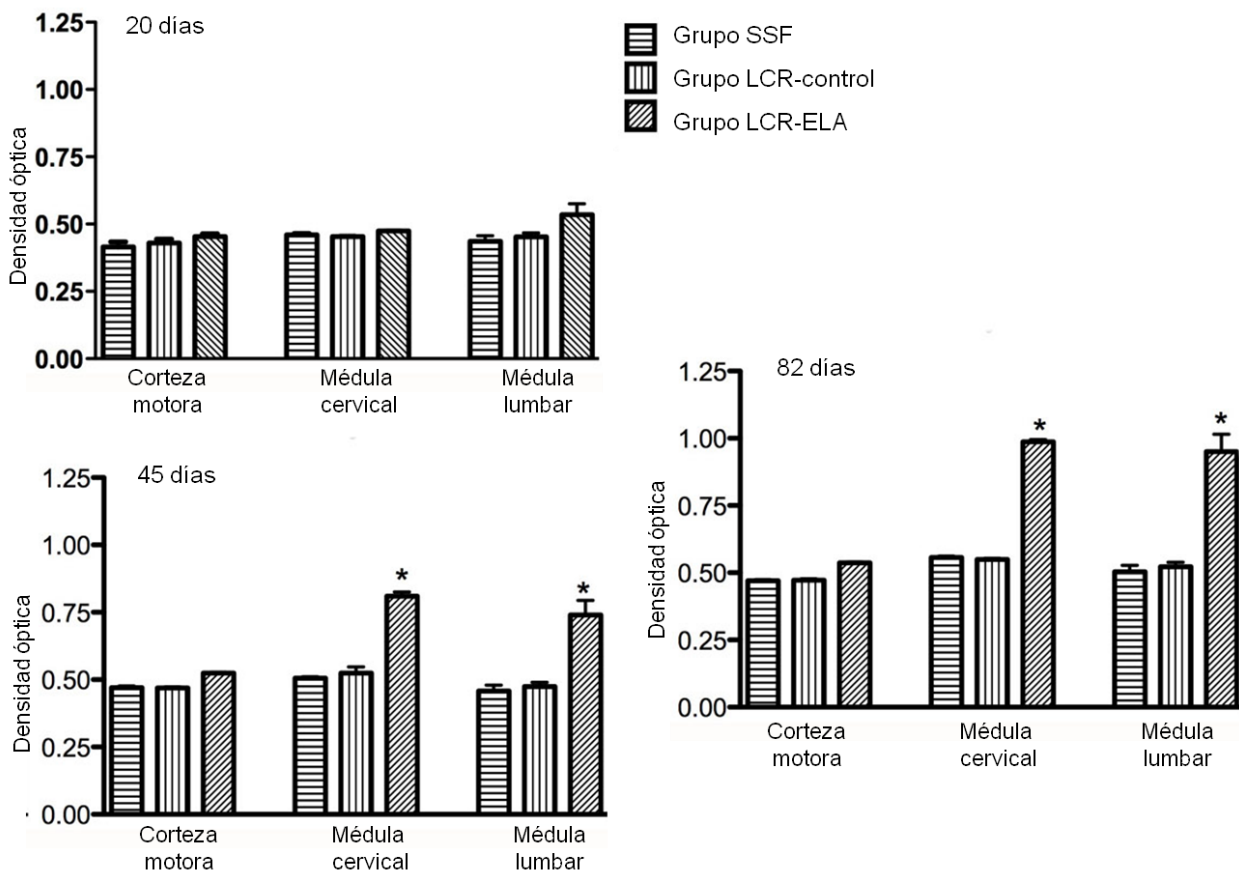
**Figura 20:** Imagen de inmunofluorescencia a los 45 días postimplantación que muestra una activación de la respuesta astrocitaria con mayor expresión de GFAP en el grupo LCR-ELA.

GFAP: 20 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	11 ± 1,2	12 ± 2,1	10 ± 4,3
LCR-control	14 ± 1,3	17 ± 1,8	18 ± 1,2
LCR-ELA	17 ± 2,1	19 ± 2,3	23 ± 3,2*
GFAP: 45 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	18 ± 2,7	19 ± 3,8	18 ± 2,19
LCR-control	19 ± 1,4	22 ± 2,4	19 ± 1,8
LCR-ELA	27 ± 0,8*	37 ± 1,9*	38 ± 3,2*
GFAP: 82 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	19 ± 2,9	20 ± 4,1	17 ± 2,4
LCR-control	18 ± 1,1	21 ± 1,3	21 ± 3,6
LCR-ELA	29 ± 3,5*	35 ± 2,9*	36 ± 4,2*

**Tabla 13:** Expresión de GFAP en los tres grupos experimentales a los 20, 45 y 82 días, resultados expresados en células inmunorreactivas por área. (\* p<0,05)

## Resultados

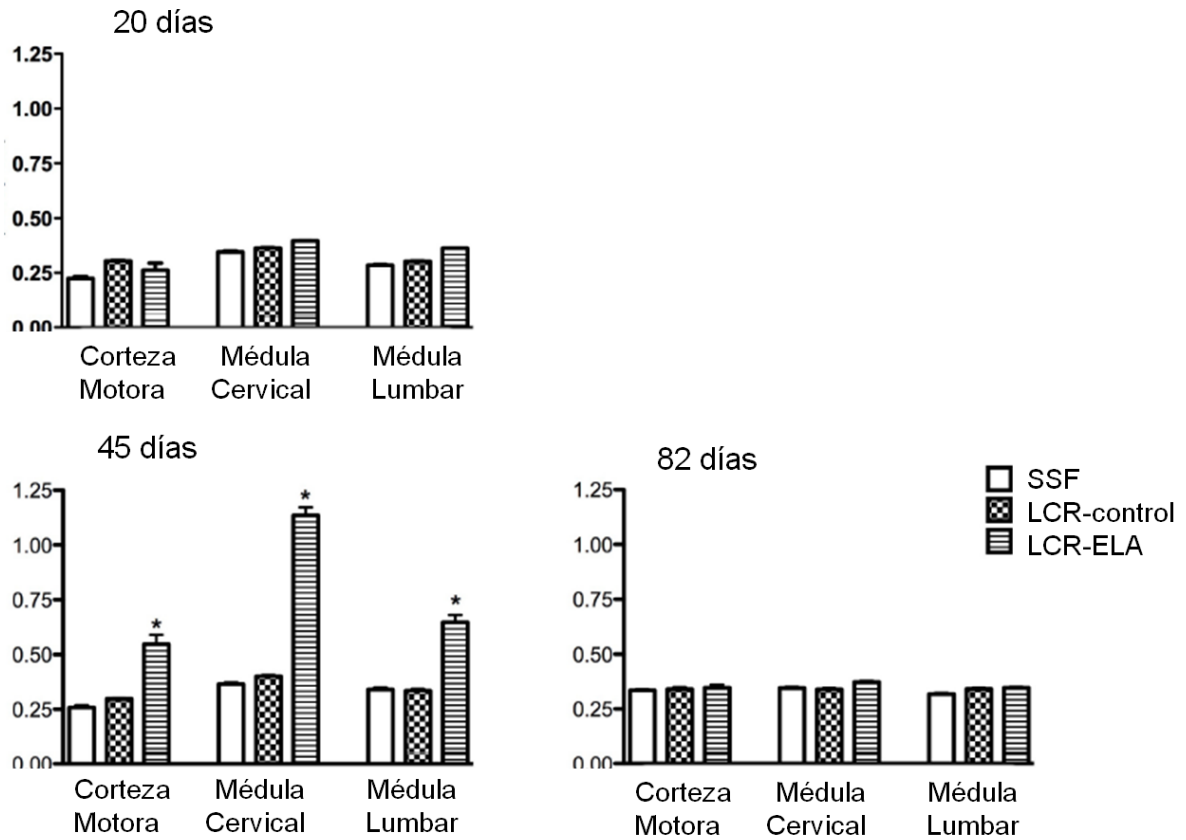
Por otro lado, se observa un aumento de la expresión de **GLT-1** (Figura 21) en la vecindad de las motoneuronas espinales en el grupo LCR-ELA, que además se correlaciona con la expresión de GFAP en los días 45 y 82 post-implantación.



**Figura 21:** Expresión de GLT-1 en los diferentes grupos experimentales, resultados expresados como densidad óptica media. Se observa aumento de la expresión en el grupo LCR-ELA en los días 45 y 82.

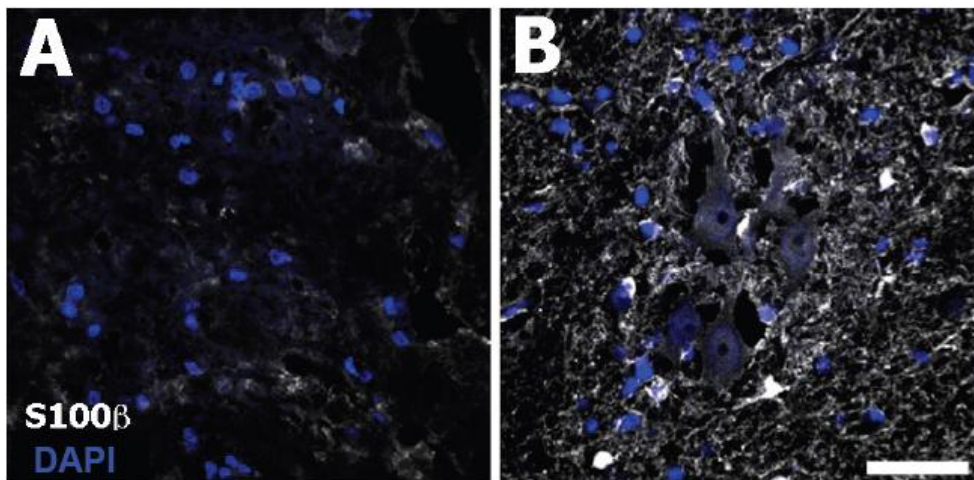
En cuanto a la expresión de **S100 $\beta$** , se observa un aumento de su expresión a los 45 días en el grupo LCR-ELA. (Figura 22)

## Resultados



**Figura 22:** Se muestran los resultados de densidad óptica de S100 $\beta$  en los tres grupos experimentales en los días 30, 45 y 82. (\*  $p < 0,05$ )

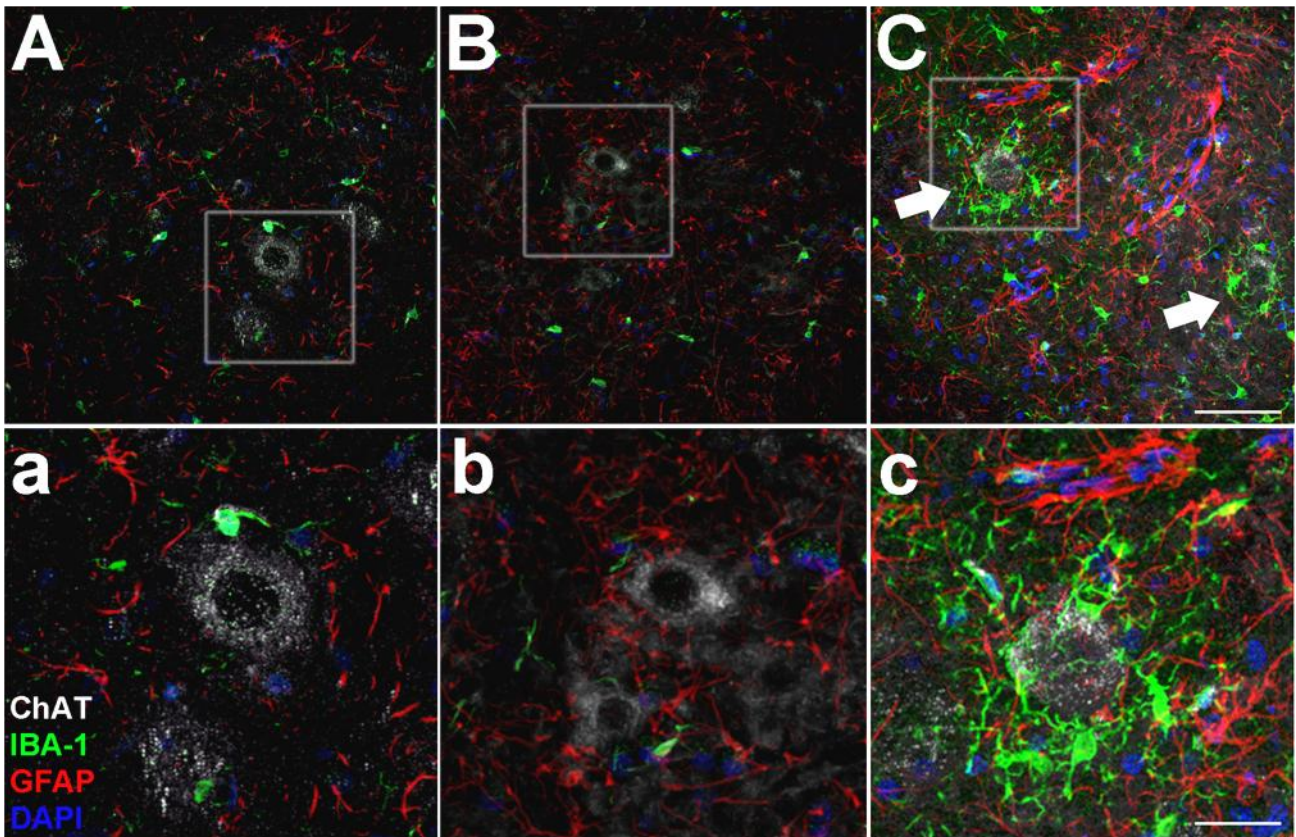
Las células que expresan S100 $\beta$  son astrocitos GFAP positivos adyacentes a las motoneuronas. (Figura 23)



**Figura 23:** A: Grupo tratado con LCR-control, B: Grupo tratado con LCR-ELA, se observa la sobreexpresión de S100 $\beta$ , especialmente en la vecindad de las motoneuronas, en el día 45 postimplantación.

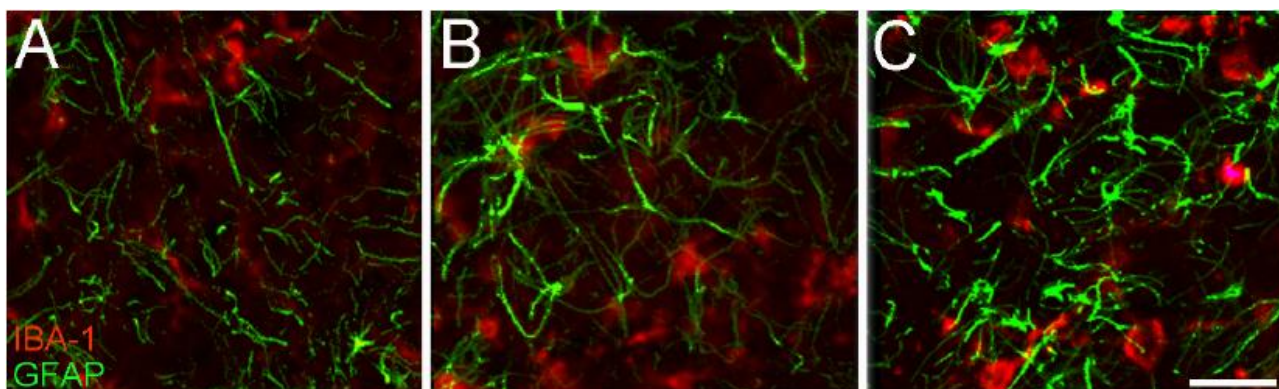
## Resultados

En la siguiente figura se puede observar la activación microglial y astrocitaria en el grupo tratado con LCR-ELA a los 45 días (Figura 24).



**Figura 24:** Imagen de microscopio confocal a los 45 días de evolución que muestra la respuesta microglial y astrocitaria en el asta anterior de la médula lumbar en los 3 grupos experimentales. Se evidencia un aumento de expresión de IBA-1 y GFAP en el grupo LCR-ELA (C,c) comparado con los grupos SSF (A,a) y LCR-control (B,b). Se observan células microgliales rodeando las motoneuronas (flechas) y astrocitos hipertróficos en el grupo LCR-ELA (C,c).

De especial interés es destacar que la sobreexpresión de GFAP aparecía algo más tarde que la activación microglial. En la siguiente figura se muestra cómo a los 20 días ya se observan cambios morfológicos de la microglía con el marcador IBA-1 y activación inflamatoria de la microglía, mientras que no es hasta los 45 días cuando se hace evidente la activación astrocitaria con sobreexpresión de GFAP. (Figura 25)



**Figura 25:** Expresión de IBA-1 y GFAP en el grupo LCR-ELA en médula espinal. A: A los 20 días la morfología astrocitaria es normal, mientras que ya se observa microglía activada. B: A los 45 días se ve una discreta activación astrocitaria, y activación microglial. C: A los 82 días se observan astrocitos activados y microglía fagocítica.

### 2.3 Expresión de caspasa 3

En el grupo tratado con LCR-ELA, a partir del día 20, se observa una sobreexpresión de caspasa 3 en corteza motora, que podría ser como consecuencia de la intervención quirúrgica, pero también se observa en médula cervical y lumbar.

La sobreexpresión de caspasa 3 implica la activación de mecanismos de apoptosis y se hace más intensa y aparece en todos los niveles estudiados en los días 45 y 82 post-implantación. (Tabla 14)

Sin embargo, en los otros dos grupos experimentales la expresión de caspasa 3 fue menor en todos los momentos estudiados.

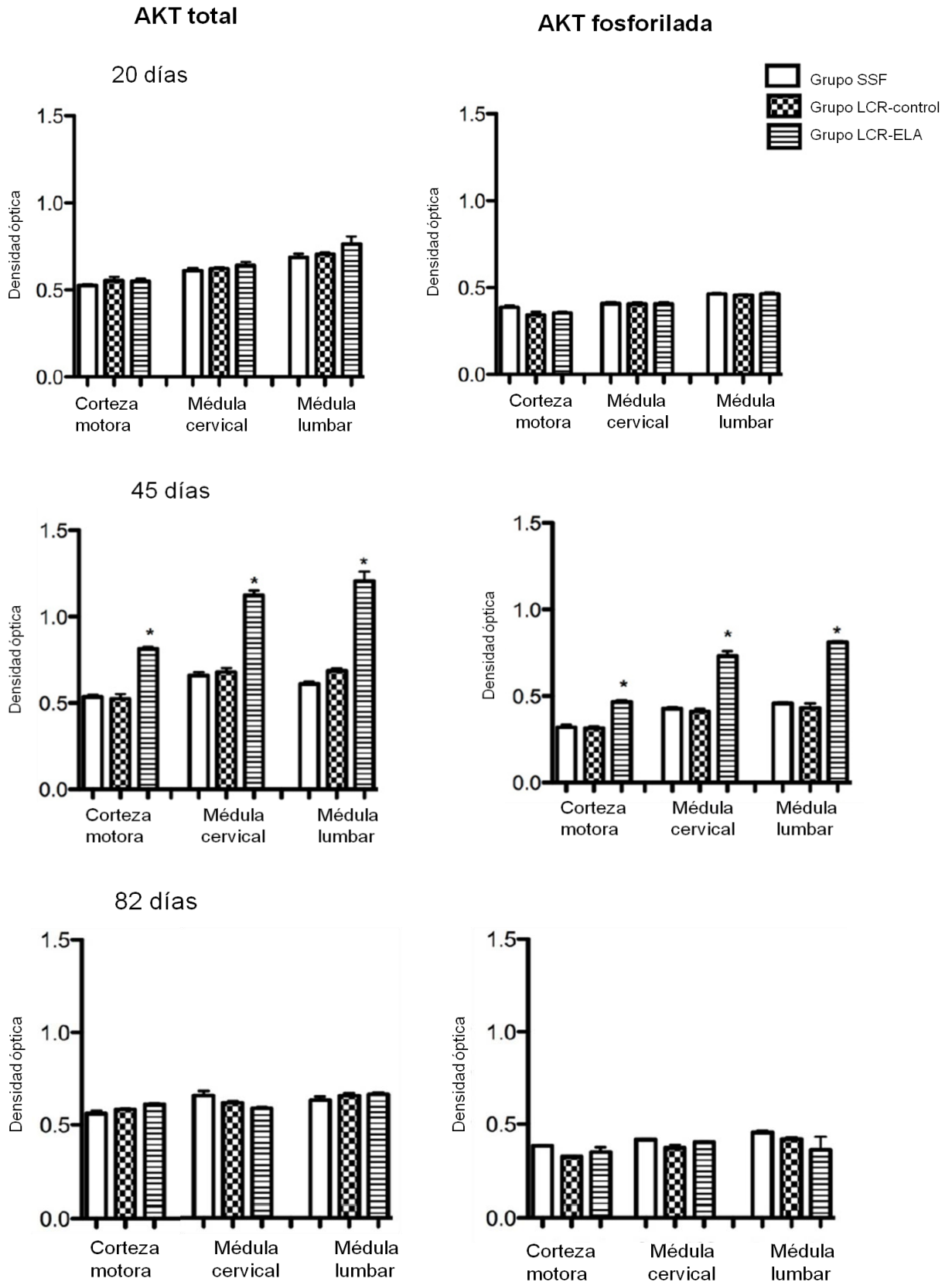
Caspasa 3: 20 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	17,1±0,9	20,5±1,1	18,5±1,4
LCR-control	18,0±1,3	21,7±1,5	18,9±1,7
LCR-ELA	27,3±1,2*	34,6±1,6*	35,4±1,8*
Caspasa 3: 45 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	18,7±0,8	20,5±0,9	19,1±1,1
LCR-control	19,4±0,9	23,1±1,3	21,9±1,2
LCR-ELA	27,4±1,1*	35,8±1,2*	35,5±1,7*
Caspasa 3: 82 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	18,9±2,1	21,5±2,8	18,3±1,6
LCR-control	18,2±1,8	24,2±2,1	21,3±2,4
LCR-ELA	31,1±1,4*	35,1±3,8*	36,5±2,7*

**Tabla 14:** Expresión de caspasa 3 en los tres grupos experimentales a los 20, 45 y 82 días, resultados expresados en células inmunorreactivas por área. (\* p<0,05)

#### 2.4 Expresión de AKT y AKT fosforilada

En el grupo LCR-ELA se observó un incremento de AKT total y AKT fosforilada a los 45 días postimplantación, con una expresión hasta 3 veces superior que la observada en los otros grupos experimentales. La expresión de AKT desciende en el día 82, con una expresión similar a la de los otros grupos. En los grupos LCR-control y SSF, no se observaron cambios en la expresión de AKT en ninguno de los momentos estudiados. (Figura 26)

## Resultados



**Figura 26:** Expresión de AKT total y AKT fosforilada en los tres grupos experimentales. Se observa un aumento significativo ( $*p < 0,05$ ) a los 45 días en el grupo tratado con LCR-ELA. Resultados expresados en densidad óptica media.

## 2.5 Expresión de periferina

Como se ha explicado anteriormente una de las características de la neuropatología de la ELA esporádica son los cuerpos de Bunina con inmunorreactividad para periferina, por ello consideramos interesante analizar su expresión en nuestro modelo.

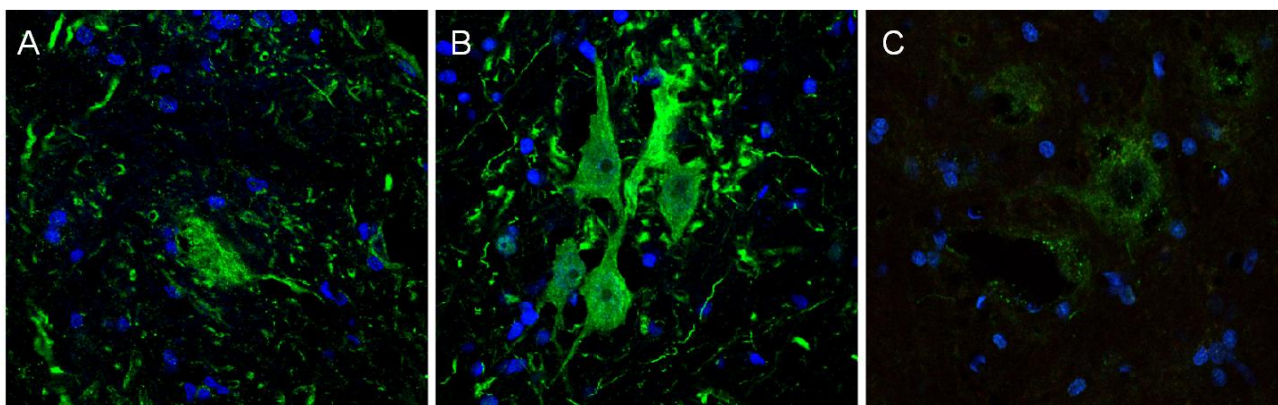
En todas las secciones del grupo LCR-ELA se encontró inmunorreactividad positiva en las motoneuronas para periferina, siendo significativa a nivel lumbar desde el día 20. A los 45 días post-implantación la expresión de periferina era 4 veces superior en el grupo LCR-ELA que en los otros grupos experimentales. (Tabla 15)

Periferina: 20 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	0,16±0,01	0,22±0,01	0,23±0,02
LCR-control	0,15±0,66	0,23±0,72	0,22±0,75
LCR-ELA	0,16±0,07	0,21±0,82	0,25±0,04*
Periferina: 45 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	0,17±0,02	0,21±0,08	0,21±0,02
LCR-control	0,16±0,04	0,22±0,72	0,23±0,03
LCR-ELA	0,51±0,021*	0,59±0,03*	0,64±0,04*
Periferina: 82 días			
Grupo	Corteza motora	Médula cervical	Médula lumbar
SSF	0,15±0,021	0,21±0,08	0,22±0,04
LCR-control	0,15±0,016	0,22±0,09	0,23±0,03
LCR-ELA	0,17±0,096	0,23±0,06	0,24±0,09

**Tabla 15:** Expresión de periferina en los tres grupos experimentales a los 20, 45 y 82 días. Se expresan los datos como densidad óptica, media ± desviación estándar. (\*p<0,05)

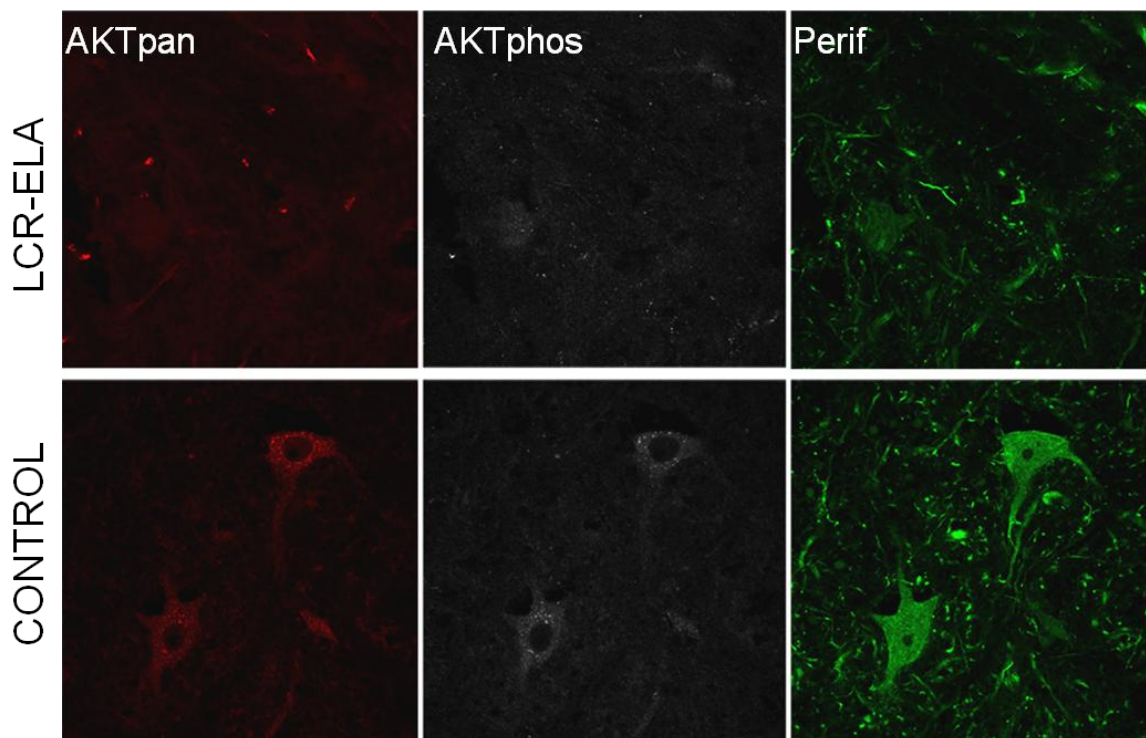
## Resultados

El marcaje de periferina en las motoneuronas se observaba principalmente en su forma normal filamentosa pero también se observaban células con un marcaje de estructuras de aspecto granular en el citoplasma que probablemente podrían corresponder a un estadio inicial en la formación de cuerpos citoplasmáticos o inclusiones de proteínas. (Figura 27)



**Figura 27:** Inmunofluorescencia que muestra la evolución de la expresión de periferina a lo largo del tiempo en el grupo experimental LCR-ELA, la expresión de periferina aumenta a los 45 días, volviendo a la normalidad en el día 82. A: 20 días, B: 45 días, C: 82 días.

Una observación interesante en el grupo LCR-ELA, es que a los 45 días, las células que presentaban una inmunorreactividad más intensa para periferina, también expresaban AKT. (Figura 28)



**Figura 28:** Imágenes de inmunofluorescencia para AKT total y fosforilada y periferina, con un aumento de su expresión en el grupo LCR-ELA a los 45 días.

## 2.6 Expresión de Cistatina C y Transferrina

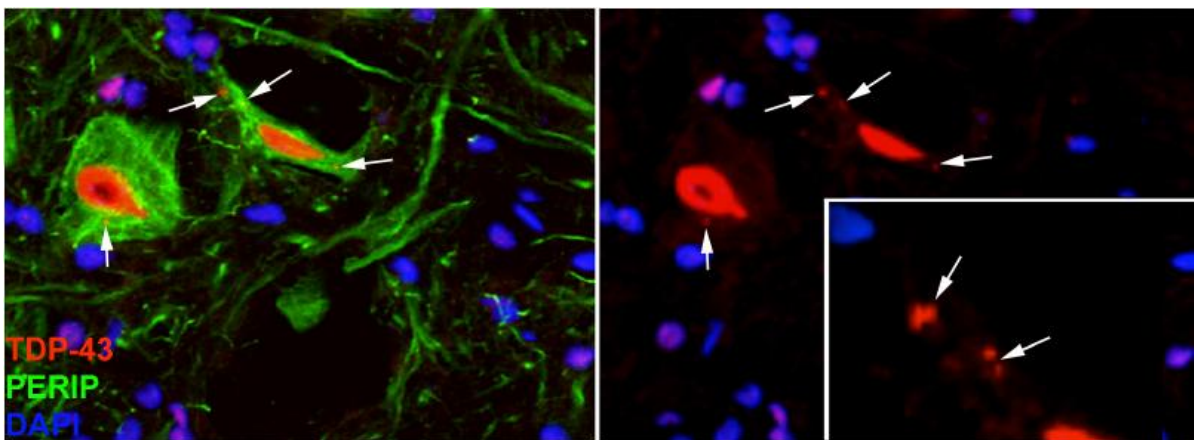
Al analizar la expresión de cistatina C y Transferrina, proteínas también presentes en los cuerpos de Bunina típicos de las formas esporádicas, se observó que en el grupo LCR-ELA su expresión estaba aumentada en las motoneuronas de todas las regiones analizadas en los días 45 y 82 en comparación con los otros grupos experimentales. (Tabla 16)

## 2.7 Expresión de Ubiquitina

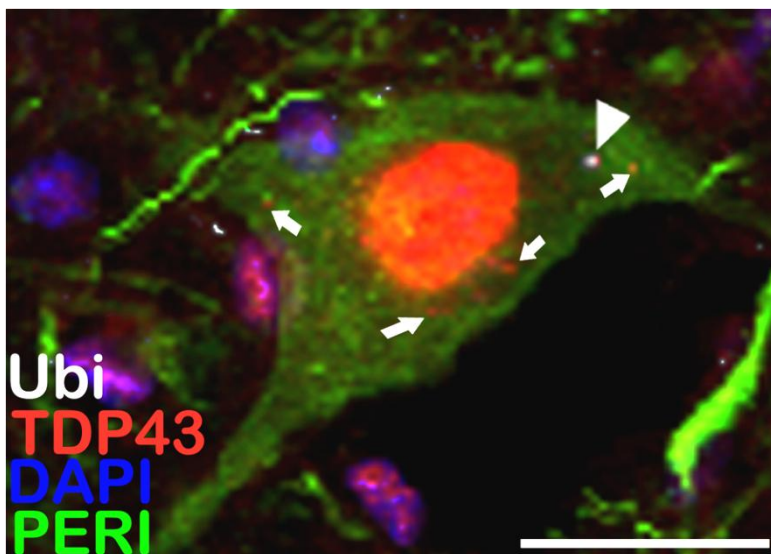
En el grupo LCR-ELA, en los días 45 y 82 de evolución, se observa un aumento de expresión de ubiquitina en las motoneuronas de todas las secciones estudiadas. (Tabla 16)

## 2.8 Expresión de TDP43

En el grupo LCR-ELA se observa una traslocación de TDP43 del núcleo al citoplasma en las motoneuronas, en forma de inclusiones, en todas las secciones estudiadas del grupo LCR-ELA a los 45 días (Figura 29). La presencia de TDP43 en el citoplasma de motoneuronas aumenta a los 82 días. Además se observó que las inclusiones citoplásmicas ubiquitinizadas, colocalizaban con TDP43 en el citoplasma de las motoneuronas (Figura 30).



**Figura 29:** Imagen de inmunofluorescencia que muestra la traslocación de TDP43 al citoplasma (flechas) en las motoneuronas del grupo tratado con LCR-ELA.



**Figura 30:** Imagen que muestra traslocación de TDP43 y colocalización con ubiquitina (punta de flecha) en el citoplasma de las motoneuronas del grupo LCR-ELA.

## Resultados

Las inclusiones citoplasmáticas, presentes en las motoneuronas de todas las secciones del grupo LCR-ELA desde el día 45 de evolución, aumentaban significativamente en el día 82, especialmente en médula lumbar (Tabla 16). El aumento del número de inclusiones a los 82 días en el grupo LCR-ELA se acompañaba de una disminución de la expresión de Akt y periferina como se ha indicado anteriormente.

	SSF						LCR-control						LCR-ELA					
	Corteza motora		Médula cervical		Médula lumbar		Corteza motora		Médula cervical		Médula lumbar		Corteza motora		Médula cervical		Médula lumbar	
<b>Días</b>	45	82	45	82	45	82	45	82	45	82	45	82	45	82	45	82	45	82
<b>TDP-43 cit</b>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++	++	++	++	+++
<b>Cistatina C</b>	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
<b>Ubiquitina</b>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	++	++	++	++	++	+++
<b>Transferrina</b>	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++	+++	++	+++	++	+++

**Tabla 16:** Resumen de la expresión de TDP43 citoplasmático, Cistatina C, Ubiquitina y transferrina en los diferentes grupos experimentales en los días 45 y 82.

- No detectado; +/- células positivas aisladas (0-1 células por  $736 \mu\text{m}^2$ ); + células positivas detectadas (2-5 células por  $736 \mu\text{m}^2$ ); ++ alta densidad de células positivas (6-9 células por  $736 \mu\text{m}^2$ ); +++ muy alta densidad de células positivas (>10 células por  $736 \mu\text{m}^2$ ).

### 2.9 Expresión de Metalotioneína

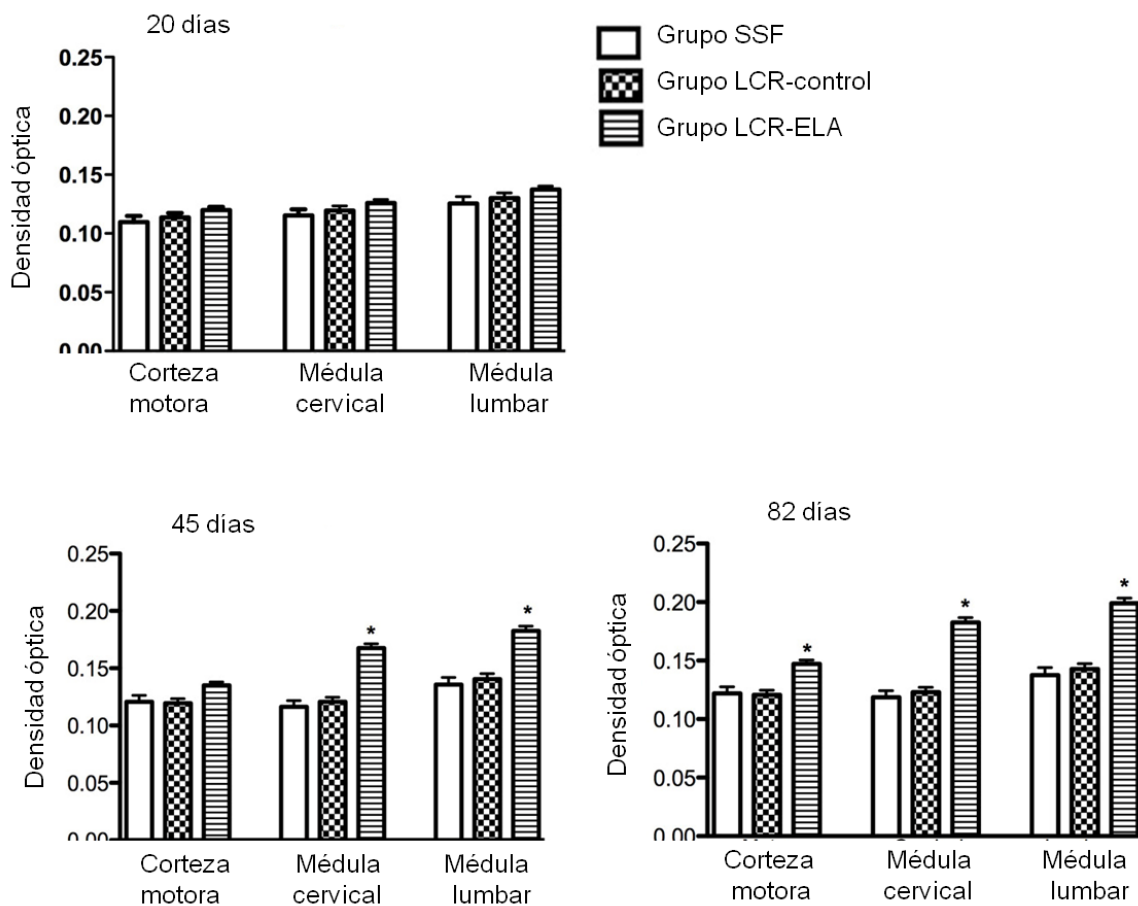
Dado que algunos estudios sugieren la implicación de la homeostasis del zinc en la patogenia de la ELA, estudiamos la expresión de una proteína de unión al zinc.

A los 20 días la expresión de metalotioneína en los tres grupos es similar, sin embargo en los días 45 y 82 se observa un aumento en la expresión

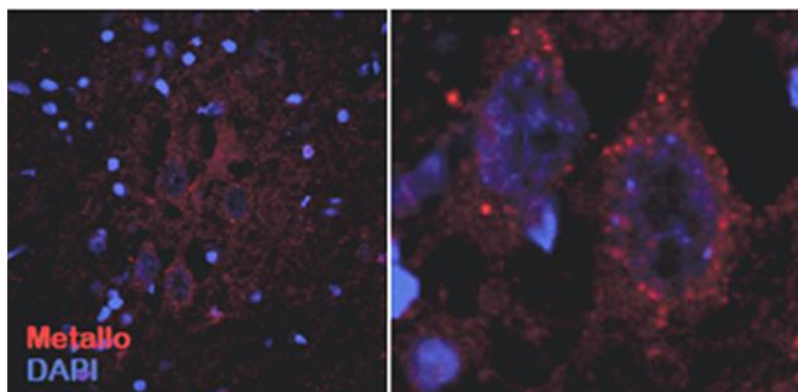
## Resultados

de metalotioneína únicamente en el grupo LCR-ELA. A los 45 días este aumento es significativo sólo en las motoneuronas de médula espinal, pero a los 82 días el aumento es significativo en todas las áreas estudiadas. (Figuras 31 y 32)

También en relación con la homeostasis del zinc estaría la sobreexpresión ya descrita de S100 $\beta$  a los 45 y 82 días en el grupo LCR-ELA, ya que esta proteína de unión a calcio, también está relacionada con la homeostasis del zinc y el cobre.



**Figura 31:** Expresión de metalotioneína en los diferentes grupos experimentales. Resultados expresados en densidad óptica media.



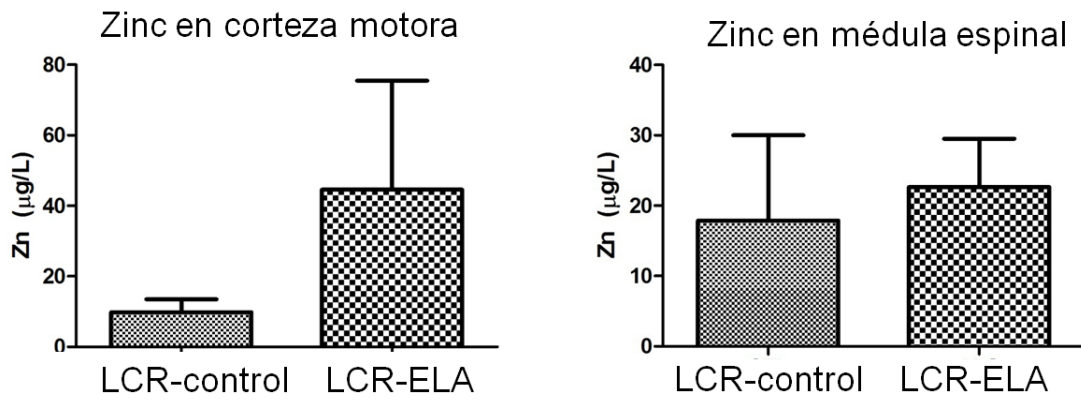
**Figura 32:** Imágenes a diferente aumento representativas de la inmunorreactividad para metalotioneína en motoneuronas espinales del grupo LCR-ELA a los 45 y 82 días.

### 2.10 Determinación de zinc en tejido

Se analizó la cantidad de zinc en secciones de corteza motora, observando que el LCR-ELA causa un aumento del contenido de zinc en el tejido (Tabla 17). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los cortes de médula espinal. (Figura 33)

	Zn $\mu\text{g}/\text{dl}$	Zn $\mu\text{g}/\text{g}$ tejido seco
Control	6.1	15.25
LCR-control	13.55 (13,5-13,6)	15.21 (14,16-16,26)
LCR-ELA	74.98 (49,2-114,5)	50.78 (39,9-66,18)

**Tabla 17:** Contenido de zinc en las secciones de corteza motora en el grupo LCR-ELA y LCR-control, se expresan los resultados como valor medio y rango.



**Figura 33:** El LCR-ELA causa un aumento del contenido de zinc en el tejido que sólo es significativo en corteza motora, no así en médula espinal.

## **V. DISCUSIÓN**



En nuestro estudio, basándonos en el efecto tóxico descrito del LCR de los pacientes con ELA, realizamos una infusión intraventricular continua en ratas de LCR procedente de pacientes con ELA así como de controles y analizamos las alteraciones histológicas causadas por el LCR-ELA, planteándonos si éste podría ser un modelo experimental de ELA.

### **1. Las ratas sobrevivieron hasta el momento del sacrificio programado sin presentar alteraciones clínicas**

A lo largo del estudio realizado no hemos observado alteraciones en las variables clínicas estudiadas, ni en el peso, ni en la escala motora de Matsumoto ni en el plano inclinado. Comparándolo con otros modelos, era poco previsible encontrar alteraciones clínicas con un tiempo de evolución desde el inicio de la infusión de LCR de 82 días. En el modelo transgénico SOD1 G93A las manifestaciones clínicas comienzan a los 90 días de edad con temblor de una extremidad, y la debilidad no es evidente hasta los 100 días. Incluso modelos transgénicos con otras mutaciones de SOD1 presentan las primeras manifestaciones clínicas más tardíamente (Kato, 2008). Sin embargo, algunos autores han observado alteraciones más precoces, durante el periodo postnatal de los roedores transgénicos SOD1, con un retraso en la adquisición de reflejos motores en este periodo (Amendola, 2004) así como alteraciones de las propiedades electrofisiológicas de la médula espinal lumbar que según los autores podrían deberse a un retraso de la maduración de las vías descendentes, y especulan que mecanismos compensatorios relacionados con la plasticidad espinal, podrían explicar el inicio tardío de la enfermedad (Durand, 2006).

Probablemente las manifestaciones clínicas en nuestro modelo sean más tardías y no hayan sido detectadas por la precocidad del sacrificio.

Desde el punto de vista neurofisiológico, se observaron discretas alteraciones electromiográficas, con aparición de ondas positivas. Aunque no se encontraron signos evidentes de denervación, nos llama la atención la aparición de ondas positivas, que podrían indicar una lesión de las motoneuronas en las ratas del grupo LCR-ELA sacrificado a los 82 días, hallazgos que serían congruentes con los signos de activación de la apoptosis encontrados en las motoneuronas de este grupo experimental.

Hemos de destacar además que hemos observado una evolución de las alteraciones histológicas encontradas en los días 20, 45 y 82 en el grupo tratado con LCR-ELA. Ante el hallazgo de una progresión de las alteraciones patológicas, especulamos que si las ratas tratadas con LCR-ELA fueran observadas de manera más prolongada probablemente desarrollarían una enfermedad de motoneurona progresiva.

## **2. La infusión de LCR procedente de pacientes con ELA en ratas causa lesiones histológicas**

Desde el primer experimento llevado a cabo en 1995 por Rao y cols (Rao, 1995) con una inyección puntual en espacio subaracnoideo en ratas de 3 días de edad de LCR procedente de pacientes con ELA y controles, se realizaron múltiples ensayos en las mismas condiciones experimentales, que han demostrado un efecto citotóxico del LCR-ELA, con aparición de lesiones

patológicas en el asta anterior medular. Se ha descrito fosforilación aberrante de neurofilamentos (Rao, 1995; Shahani 2001, Shahani 2004), astrogliosis con sobreexpresión de GFAP (Shahani, 1998) y S100 $\beta$  (Shobha, 2010), fragmentación del aparato de Golgi (Ramamohan, 2007), signos de estrés de retículo endoplásmico (Vijayalakshmi, 2011) así como menor expresión de factores neurotróficos (Deepa, 2011).

Con nuestro experimento hemos demostrado que la administración intraventricular continua y prolongada de LCR procedente de pacientes con ELA provoca la aparición de lesiones histológicas en corteza motora y asta anterior medular cervical y lumbar.

En nuestro modelo en el día 20 postimplantación ya se observan los primeros cambios en la arquitectura celular en el grupo tratado con LCR-ELA, observando inicialmente una activación microglial seguida de astrogliosis.

En el modelo SOD1 G93A también se ha descrito una activación microglial que precede a la clínica motora y aparece alrededor de los 70-80 días de edad (Alexianu, 2001; Graber, 2010). Sin embargo, y a diferencia de nuestro modelo en el que la astrogliosis también es presintomática, en el modelo SOD1 la astrogliosis aparece coincidiendo con el inicio de la clínica motora alrededor del día 100 (Hall, 1998; Alexianu, 2001; Graber, 2010).

La primera alteración observada en las motoneuronas del asta anterior medular en el modelo SOD1 G93A es la presencia de vacuolas desde los 70 días de edad, antes del inicio de la clínica motora. Estas vacuolas se originan

de la dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso y de las mitocondrias degenerantes (Dal Canto, 1994). A medida que la enfermedad progresa, hacia los 100-110 días, comienza a disminuir el número de motoneuronas en el asta anterior, la vacuolización es intensa y aparecen algunas inclusiones. A partir de los 120 días, la vacuolización es menos marcada y son más prominentes las inclusiones (Kato, 2008).

En nuestro modelo, las primeras alteraciones moleculares que observamos en las motoneuronas, desde nuestro punto de vista, podrían representar mecanismos que traten de ser protectores. Así en el grupo sacrificado en el día 45 encontramos una sobreexpresión de periferina, de metalotioneínas y de Akt, mientras que éstas disminuyen en el grupo sacrificado en el día 82, momento en el que se hace evidente un aumento de las inclusiones de TDP43 y ubiquitina y se encuentran signos de apoptosis con sobreexpresión de caspasa 3. Además, estas alteraciones histológicas y moleculares en el grupo LCR-ELA aparecen sin que se observe degeneración de motoneuronas.

Todos estos hallazgos se discutirán a continuación en detalle.

### **3. La activación microglial aparece precozmente a partir de los 20 días en el grupo tratado con LCR-ELA**

Entre los diferentes mecanismos patogénicos que contribuyen a la degeneración de motoneuronas en la ELA se encuentra una respuesta neuroinflamatoria con activación de las células de microglía. Evidencias recientes sugieren que esta respuesta inflamatoria no es sólo una

consecuencia tardía de la neurodegeneración, sino que contribuye activamente al balance entre neuroprotección y neurotoxicidad, siendo inicialmente protectora, pero después contribuyendo a la progresión del daño neural (Beers, 2011).

Las células de microglía son un componente del sistema inmune innato a nivel del SNC. Pueden liberar moléculas pro y antiinflamatorias, y pueden tener efecto protector o tóxico sobre las neuronas. Como respuesta a una lesión, las células de microglía sufren cambios morfológicos y una activación funcional con fagocitosis, producción de radicales libres de oxígeno, citoquinas, y factores de crecimiento. Esta activación probablemente se deba a señales procedentes de las neuronas dañadas, glía y puede que de dianas periféricas (Beers, 2011).

En autopsias de pacientes con ELA se ha observado un aumento de la microglía activada en la médula espinal, además de presencia de células dendríticas maduras e inmaduras así como un aumento de la expresión de la quimioquina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*) en células gliales, capaz de reclutar más células del sistema inmune de la circulación sistémica al SNC, y de alterar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Henkel, 2004). Se ha descrito también que el LCR de pacientes con ELA tiene niveles elevados de quimioquinas y citoquinas como MCP-1 y TNF $\alpha$  (Sargsyan, 2009).

En el modelo SOD1 G93A también se observan las alteraciones morfológicas indicativas de activación microglial, así como una elevada producción de MCP-1. Además, las células microgliales activadas están presentes antes de la aparición de síntomas motores en el roedor e incluso se

ha observado expresión de MCP-1 antes de la activación microglial (Henkel, 2006).

Se especula que el fenotipo proinflamatorio de la microglía y la expresión de MCP-1 dan lugar a una respuesta inflamatoria como respuesta al daño neural que propagaría la degeneración de motoneuronas en ELA (Sargsyan, 2009). Apoyando esta hipótesis, en el modelo animal SOD1 se han observado diferencias regionales y temporales en los fenotipos de la población de microglía y linfocitos en la médula espinal a lo largo de la evolución de la enfermedad. En estadios iniciales hay un fenotipo protector de microglía en la médula espinal lumbar, que cambia rápidamente a una respuesta tóxica, sin embargo, a nivel cervical, donde la progresión de la enfermedad es más lenta, el fenotipo de microglía antiinflamatorio contribuye a una respuesta protectora (Beers, 2011).

En nuestro experimento, hemos analizado la respuesta de la microglía mediante el marcador IBA-1, proteína de unión a calcio que se expresa de forma específica en células de microglía y que está sobreexpresada durante la activación de estas células. Hemos observado que existe una activación microglial en respuesta a la toxicidad del LCR-ELA, y que ésta aparece ya de forma discreta a partir de los 20 días en médula lumbar, aumentando en intensidad y estando sobreexpresada en todos los segmentos estudiados a los 45 y 82 días. En los segmentos espinales las células de microglía se sitúan en estrecho contacto con las motoneuronas y muestran cambios morfológicos característicos de la microglía activada, pasando de un estado basal en reposo ramificado con finas prolongaciones, a un estado activado con un aspecto

ameboide con un cuerpo celular redondeado con cortas y gruesas. Estos cambios morfológicos indican una respuesta de la microglía con una activación fagocítica (Kettenmann, 2011), y se observan a partir de los 20 días, cuando las células de microglía ya presentan una morfología con un cuerpo celular elongado y prolongaciones más gruesas, mientras que en los días 45 y 82 ya se observan células ameboides.

Además, observamos una sobreexpresión de MHC-II que es significativamente mayor en el grupo LCR-ELA a partir del día 20 en todos los segmentos estudiados. MHC-II está implicado en la presentación de antígenos a los linfocitos T y en condiciones normales, la expresión de MHC-I y II en el SNC es muy baja. Ante procesos patológicos que desencadenen una respuesta inflamatoria, aumenta la expresión de MHC, permitiendo la presentación de antígenos y una respuesta inmune específica. La microglía activada en ELA, además de liberar citoquinas, atrae a un pequeño número de linfocitos T mediante la presentación de antígenos con MHC-II (Neumann, 2001).

Diferentes estudios han tratado de demostrar cuál es la contribución relativa de motoneuronas y células no neurales sobre el desarrollo de la ELA. Mediante la generación de modelos animales quiméricos, con una mezcla de células normales y células que expresan SOD1 mutada, se observa que la presencia de motoneuronas normales retrasa el inicio de la enfermedad, incluso en algunos casos no había ningún signo de degeneración neuronal. Sin embargo, la presencia de células no neurales no portadoras de la mutación

rodeando a las motoneuronas mutadas, prolonga la supervivencia de las motoneuronas (Clement, 2003).

En cuanto al papel de las células de microglía en concreto, experimentos con ratones transgénicos SOD1 G93A con microglía no portadora de la mutación muestran un enlentecimiento de la progresión de la enfermedad, pero no del momento de inicio. Por otro lado, la expresión de SOD1 exclusivamente en las células de microglía no induce una enfermedad de motoneurona (Beers, 2006). De modo que la reducción de la carga de SOD1 mutada en motoneuronas retrasa el inicio de la enfermedad, mientras que la reducción de la expresión de SOD1 mutada en microglía retrasa la progresión y prolonga la supervivencia. Por tanto, el inicio de la enfermedad estaría más relacionado con la expresión de SOD1 mutada en las motoneuronas y la progresión de la enfermedad con la expresión de SOD1 mutada en microglía y su respuesta inflamatoria (Boillee, 2006).

En conclusión, de todos estos estudios se podría inferir que en la patogenia de la ELA, la presencia de microglía activada con un fenotipo proinflamatorio, que expresa y libera diferentes moléculas proinflamatorias, influye directamente en la extensión del daño neural y en la tasa de progresión de la enfermedad.

#### **4. Existe una activación astrocitaria definida por una mayor expresión de GFAP, S100 $\beta$ y GLT-1 en el grupo tratado con LCR-ELA**

Los astrocitos en condiciones fisiológicas proporcionan soporte estructural, metabólico y trófico a las neuronas, manteniendo un microambiente adecuado

para la supervivencia neuronal, sin embargo, en condiciones patológicas, los astrocitos reactivos, pierden esta función de soporte y pueden inducir o agravar la disfunción de las neuronas. En ELA la degeneración neuronal se acompaña de astrogliosis reactiva que rodea tanto a las motoneuronas inferiores como a las superiores. En los ratones transgénicos SOD1, se observa un patrón similar de astrogliosis, aunque el momento de aparición relativo a la degeneración de motoneuronas y el inicio de los síntomas varía en según los modelos con diferentes mutaciones (Vargas, 2010).

La proteína GFAP o proteína ácida fibrilar glial es el principal filamento intermedio de los astrocitos maduros, implicada en su motilidad así como en el mantenimiento de la estructura y de las prolongaciones astrocitarias. En el SNC, como respuesta a diferentes tipos de lesiones, los astrocitos responden de una manera típica conocida como astrogliosis reactiva. La astrogliosis se acompaña de una sobreexpresión de GFAP (Eng, 2000).

En autopsias de pacientes con ELA se ha objetivado un aumento de la expresión de GFAP, con astrocitos reactivos que muestran una intensa inmunorreactividad para GFAP, especialmente en las prolongaciones (Fujita, 1998).

Además del aumento de la inmunorreactividad para GFAP, los astrocitos en ELA presentan un aumento de la expresión de S100 $\beta$  y otros marcadores inflamatorios tales como ciclooxigenasa-2 y óxido nítrico sintetasa inducible (Vargas, 2010). S100 $\beta$  es una proteína de unión a calcio sintetizada principalmente por los astrocitos con múltiples funciones celulares, implicada en el metabolismo energético, en la integridad del citoesqueleto, modula la

proliferación y diferenciación de neuronas y glía, etc. En condiciones fisiológicas tiene efectos neuroprotectores, pero un aumento de su expresión puede llevar a la neurodegeneración. Se ha descrito una sobreexpresión de esta proteína en diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la ELA (Rothermundt, 2003).

En autopsias de pacientes con ELA esporádica se ha observado una sobreexpresión de S100 $\beta$  en el citoplasma de astrocitos con morfología reactiva, en el asta anterior. Pero además en estos pacientes, y a diferencia de los controles, se observa inmunorreactividad para S100 $\beta$  en las motoneuronas supervivientes, incluso en un pequeño porcentaje de motoneuronas sin signos de degeneración. La sobreexpresión de S100 $\beta$  podría ser una respuesta ante el estrés oxidativo, como mecanismo de defensa, o bien la sobreexpresión podría tener un efecto neurotóxico (Migheli, 1999). Algunos experimentos sugieren que los pacientes con ELA con niveles más bajos de S100 $\beta$  en LCR tendrían mejor pronóstico, apoyando la contribución de los astrocitos en la neurodegeneración (Süssmuth, 2010).

La administración intratecal de LCR-ELA en ratas de forma puntual causa un aumento de la expresión de S100 $\beta$  en los astrocitos del asta anterior (Shobha, 2010) así como un aumento de la expresión de GFAP (Shahani, 1998; Shobha, 2010). Los resultados de nuestro experimento son similares, de manera que la administración intraventricular continuada de LCR-ELA en ratas causa una astrogliosis reactiva con sobreexpresión de las proteínas S100 $\beta$  y GFAP, observándose estas alteraciones en los días 45 y 82 postimplantación.

Otro marcador astrocitario, el transportador GLT-1, también conocido como EAAT2, es uno de los transportadores de glutamato de los astrocitos encargados de recaptar el exceso de glutamato extracelular. Una de las hipótesis de la degeneración de motoneuronas en ELA propone que una alteración de los transportadores de glutamato gliales causaría un exceso de glutamato en la sinapsis con la consiguiente excitotoxicidad. En autopsias de pacientes con ELA se ha observado una menor expresión de GLT-1 en la corteza motora y médula espinal (Rothstein, 1995). En los diferentes modelos transgénicos de SOD1, se ha encontrado una disminución de la expresión de GLT-1, que se hace más evidente a medida que evoluciona la enfermedad (Vargas, 2010). En el modelo en el que realizan una inyección intratecal puntual de LCR-ELA en ratas, Shobha et al observaron una disminución de la expresión de GLT-1 en el asta anterior medular (Shobha, 2007).

En nuestro experimento sin embargo, hemos observado un aumento de la expresión de GLT-1 en segmentos espinales tras la administración intraventricular prolongada de LCR-ELA, en los días 45 y 82 postimplantación. Consideramos que el aumento de GLT-1 es una expresión más de la astrogliosis reactiva, y la diferencia con los hallazgos en humanos podría deberse a que las autopsias representan los estadios finales de la enfermedad, de manera que algunos marcadores pueden estar sobreexpresados en fases precoces y disminuir en fases finales una vez evolucionada la enfermedad. Por el mismo motivo podría explicarse la diferencia con el modelo SOD1, de hecho, se ha observado que a medida que progresa la enfermedad en el modelo los niveles de GLT-1 disminuyen, aunque también podría deberse a algún mecanismo patogénico diferente en el modelo SOD1.

En conclusión, la activación astrocitaria que hemos observado en nuestro modelo experimental es comparable a las alteraciones ya descritas por otros autores tras la administración puntual de LCR-ELA (Shahani 1998, Shobha 2010), y está en concordancia con lo descrito en autopsias de pacientes con ELA y en el modelo transgénico SOD1. En comparación con el modelo SOD1, en nuestro modelo la astrocitosis es más precoz que en el modelo G93A, en el que la astrogliosis aparece coincidiendo con el inicio de la clínica motora alrededor del día 100 (Hall, 1998; Alexianu, 2001; Graber, 2010), aunque otros modelos SOD1 también presentan una astrogliosis precoz antes del inicio de la clínica, que se hace más evidente a medida que la clínica progresa (Vargas, 2010).

Por último, cabe recordar que de manera análoga a los experimentos diseñados para analizar la contribución relativa de la microglía en la degeneración de las motoneuronas en ELA, diversos estudios han tratado de averiguar si las alteraciones observadas en los astrocitos en el modelo SOD1 representan una disfunción primaria de este tipo celular o bien un fenómeno secundario al daño neural. En uno de ellos, se diseñó un modelo transgénico que expresaba SOD1 mutada exclusivamente en astrocitos bajo el control del promotor de GFAP, observando sólo una activación astrocitaria sin que el animal desarrollara una enfermedad de motoneurona. Por tanto, sería necesaria una disfunción primaria de las motoneuronas para el inicio de la enfermedad, que desencadenaría una respuesta astrocitaria perjudicial, con liberación de citoquinas y/o alteraciones en la expresión de transportadores de glutamato que potenciarían y propagarían el daño neural. Sin embargo, el hecho de que la expresión de SOD1 mutada también sea capaz de causar de

forma directa astrogliosis, sugiere que la astrogliosis en ELA deriva tanto de un fenómeno primario como secundario a la disfunción neural (Gong, 2000a). Por otro lado, la expresión de SOD1 mutada exclusivamente en motoneuronas tampoco causa la enfermedad, lo cual apoya la hipótesis de que las células no neurales también son necesarias para el desarrollo de la enfermedad (Pramatarova, 2001).

#### **5. En las ratas tratadas con LCR-ELA la activación microglial es anterior a la activación astrocitaria**

Es una realidad que la microglía y los astrocitos están implicados en el proceso patológico de la ELA. Sin embargo, todavía es incierto en qué momento del proceso patogénico participan cada uno de ellos.

Varios autores han tratado de responder a esta cuestión analizando si la respuesta de los astrocitos aparece antes o después que la activación microglial en el modelo transgénico SOD1. Hall et al observan que tanto la activación de los astrocitos como de la microglía son significativas a partir de los 100 días, al inicio de la clínica motora. La activación microglial ganaba intensidad a medida que progresaba la enfermedad, mientras que la astrocitosis disminuía en intensidad (Hall, 1998). Sin embargo, estudios posteriores (Alexianu, 2001; Graber, 2010) observan la activación microglial desde estadios más precoces, antes de la aparición de síntomas motores (alrededor de los 70-80 días), mientras que la respuesta astrocitaria con aumento de expresión de GFAP aparece más tarde cuando ya es evidente la

clínica motora. Para estos autores la microglía representa la respuesta inmune inflamatoria inicial ante el daño neural, y estaría más relacionada con la neurodegeneración en estadios presintomáticos. Los astrocitos serían reclutados más adelante en un intento de “reparar y limpiar”. Sin embargo las citoquinas inflamatorias y factores tóxicos amplifican y mantienen el carácter destructivo del proceso inmune, con una progresiva pérdida de motoneuronas, siendo la respuesta inmune más intensa a medida que la enfermedad progresa (Alexianu, 2001; Graber, 2010).

En nuestro experimento, tanto la activación microglial como astrocitaria aparecen en un estadio presintomático, pero en la misma línea que estos últimos estudios, observamos que la primera alteración, en respuesta a la toxicidad del LCR-ELA es la activación microglial, que aparece ya de forma discreta con cambios morfológicos celulares y sobreexpresión de MHC-II a los 20 días, y aumenta significativamente en intensidad a los 45 y 82 días. Sin embargo, la astrogliosis y la sobreexpresión de GFAP aparecen a partir de los 45 días. Este orden de los eventos apoya un mecanismo neuroinflamatorio de la toxicidad del LCR-ELA.

#### **6. Existe un aumento de expresión de caspasa 3 indicadora de apoptosis en el grupo tratado con LCR-ELA**

Múltiples evidencias apuntan a la implicación de mecanismos de apoptosis en la muerte de las motoneuronas en ELA. Las caspasas son cisteín proteasas esenciales en los procesos de apoptosis. Las dos vías principales de apoptosis

son la extrínseca o citoplásmica mediada por receptor y la intrínseca o mitocondrial.

Los hallazgos en el modelo SOD1 sugieren que la muerte celular podría estar mediada por la vía mitocondrial de la apoptosis. En esta vía la descarga de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma activa la cascada de caspasas. Guegan et al demostraron una traslocación de citocromo C de la mitocondria al citoplasma en el modelo SOD1. Como consecuencia, se observa una activación de caspasa 9 seguida por la activación de caspasa 7 (Guegan, 2001). En el modelo SOD1 también se ha objetivado expresión de caspasa 1 y caspasa 3 activas en médula espinal (Li, 2000; Pasinelli, 2000). Además la inhibición de las caspasas en este modelo, por ejemplo mediante infusión intraventricular de inhibidores de caspasas, prolonga la supervivencia del animal (Li, 2000).

Muchos autores apuestan por la existencia de un desequilibrio entre factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos en las motoneuronas en ELA. En el modelo SOD1 la expresión de proteínas antiapoptóticas del grupo Bcl-2 está disminuida, mientras que la expresión de la proteína proapoptótica Bax está aumentada. También en pacientes con ELA esporádica se ha descrito una sobreexpresión de Bax y de proteínas proapoptóticas del grupo Bcl-2 (Sathasivam, 2005).

Para valorar la activación de mecanismos apoptosis en las motoneuronas en nuestro modelo experimental, estudiamos la expresión de caspasa 3. La caspasa 3 es una caspasa efectora, que puede ser activada por caspasas iniciadoras tanto de la vía intrínseca como de la extrínseca de la apoptosis. En

nuestro experimento, el grupo tratado LCR-ELA presenta un aumento de la expresión de caspasa 3 en todas las secciones estudiadas en todos los momentos estudiados, indicativo de puesta en marcha de vías de apoptosis de forma precoz como consecuencia de la toxicidad del LCR-ELA.

En cuanto a las autopsias de pacientes con ELA esporádica, también se ha descrito activación de caspasas 1 (Li, 2000), 3 y 9 (Sathasivam, 2005), y Guegan et al sugerían un mecanismo de apoptosis mitocondrial al observar también una traslocación de citocromo C al citoplasma de pacientes con ELA esporádica (Guegan, 2001).

Sin embargo, también hay evidencias que sugieren la activación de la vía extrínseca de la apoptosis en la ELA esporádica. Por ejemplo, la presencia de Cistatina C en los cuerpos de Bunina típicos de SALS. La Cistatina C es una proteína inhibidora de proteasas, entre ellas catepsina B, que pueden dirigir a la célula hacia la apoptosis mediante diferentes mecanismos implicados en la vía extrínseca de apoptosis. También apoyaría un mecanismo de apoptosis mediada por receptor el hecho de que se han encontrado anticuerpos anti-FAS en suero de algunos pacientes con ELA esporádica. La activación del receptor FAS en motoneuronas por los anticuerpos daría lugar a la activación de caspasa 8 y por tanto de la cascada de apoptosis (Yi, 2000). Los diferentes mecanismos de muerte celular en ELA esporádica mediante la vía extrínseca y en el modelo SOD1 mediante la vía mitocondrial podrían explicar que algunos tratamientos eficaces en el modelo animal hayan fracasado en los ensayos clínicos en humanos, como la minociclina (Matías-Guiu, 2008).

En nuestro modelo no podemos obtener conclusiones sobre la vía activada ya que sólo hemos analizado la caspasa 3, común a ambas vías. Sin embargo, es una observación no publicada del grupo de Yañez y cols que el LCR-ELA causa sobre cultivos de motoneuronas además de un aumento de caspasa 3, un aumento de la concentración de TNF $\alpha$ , que activaría la vía de apoptosis mediada por receptor o extrínseca (Ver Anexo I).

### **7. Observamos un incremento transitorio de marcadores anti-apoptóticos en el grupo tratado con LCR-ELA**

Para ver si el incremento de caspasa 3 iba acompañado de cambios en la expresión de otras proteínas implicadas en la supervivencia celular y apoptosis, medimos la expresión de Akt total y Akt fosforilada que es su forma activa.

Akt es una serina/treonina kinasa con un importante papel en la regulación de la maquinaria de apoptosis. Akt promueve la supervivencia celular y bloquea la apoptosis inducida por diferentes estímulos apoptóticos. Se ha sugerido que ejerce esta función manteniendo la integridad mitocondrial e inhibiendo la liberación de citocromo c mitocondrial al citosol (Kennedy, 1999). Sin embargo otros autores defienden que Akt ejerce su acción más adelante en la cascada de la apoptosis ya que puede inhibir la apoptosis incluso en presencia de citocromo c en el citosol. Además Akt es capaz de fosforilar e inactivar a Bad (miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) así como a la caspasa 9 (Zhou, 2000).

Akt es activa en su forma fosforilada, y la proteína PI3K (fosfatidil-inositol- 3-kinasa) es una de las encargadas de fosforilar y por tanto activar a Akt. Este es uno de los mecanismos por los que factores de crecimiento tales como NGF (*nerve growth factor*) VEGF (*vascular endothelial growth factor*) o IGF-1 (*insulin-like growth factor*) promueven la supervivencia celular (Kennedy, 1999). Se ha observado un aumento de los niveles y la actividad de PI3K en médula espinal de pacientes con ELA esporádica, sin embargo no se observa un aumento de la actividad de Akt en estos casos (Wagey, 1998). Por otro lado, algunos autores han observado en pacientes con ELA esporádica y familiar una disminución de Akt fosforilada en las motoneuronas supervivientes (Dewil, 2007).

En el modelo SOD1, en ratones en estadios presintomáticos, antes de que haya pérdida de motoneuronas, se ha observado una disminución de la expresión de PI3K y Akt en motoneuronas del asta anterior (Warita, 2001; Nagano, 2002; Dewil, 2007). Se ha sugerido que esta regulación a la baja de la vía PI3K/Akt pueda tener un papel en los eventos iniciales de la patogénesis de la ELA (Warita, 2001), de manera que la pérdida de Akt fosforilada contribuiría a la muerte neuronal más que tratarse de un fenómeno secundario (Dewil, 2007). Los diferentes hallazgos con respecto a los estudios en humanos podrían deberse o bien a una diferente patogenia entre ELA esporádica y el modelo animal o bien al hecho de que las autopsias representan un estadio final de la enfermedad (Warita, 2001).

El efecto citotóxico del LCR-ELA en nuestro experimento causa un aumento de la expresión de Akt total y Akt fosforilada en el día 45 postimplantación, sin

embargo los niveles de expresión vuelven a valores similares a los otros grupos en el día 82. Consideramos que este aumento transitorio de factores anti-apoptóticos podría representar una respuesta inicial que trate de ser protectora ante el estrés generado por la toxicidad del LCR-ELA.

#### **8. La expresión de periferina aumenta de forma transitoria en el grupo tratado con LCR-ELA**

La periferina es una proteína de los filamentos intermedios de tipo III, que se expresa principalmente en nervios autonómicos y neuronas sensitivas periféricas. La expresión génica de periferina en motoneuronas espinales es baja en condiciones normales, pero puede aumentar en determinadas situaciones, como por ejemplo en respuesta a citoquinas inflamatorias. Su expresión se ha visto aumentada en respuesta a daño traumático neuronal como axotomía o isquemia, y aunque su papel en el daño neuronal no está claro, podría estar implicado en la regeneración neuronal (Mc Lean, 2010).

Siguiendo este razonamiento, la presencia de periferina en las inclusiones de los pacientes con ELA podría ser una forma de respuesta de las motoneuronas al estrés que tratara de ser neuroprotectora. Sin embargo, el modelo transgénico roedor que sobreexpresa periferina presenta una enfermedad de motoneurona de inicio tardío con formación de agregados citoplásmicos de filamentos intermedios que aparecen antes que los primeros síntomas de debilidad, por lo que la sobreexpresión de periferina contribuiría a la neurodegeneración (Beaulieu, 1999).

Por otro lado, la expresión de periferina está asociada con la generación de múltiples isoformas y cambios en el ratio entre ellas o bien la generación post-transcripcional de variantes anormales puede alterar las propiedades normales de la red de filamentos (Mc Lean, 2010). Así, se ha observado una expresión anormal de isoformas neurotóxicas de periferina, que inducen la formación de agregados en el modelo SOD1 en estadio sintomático. Estas isoformas también se han encontrado en la médula espinal de algunos pacientes con ELA (Robertson, 2003; Mc Lean, 2010).

En autopsias de algunos pacientes con ELA esporádica se había observado inmunorreactividad para periferina en inclusiones ubiquitinadas de motoneuronas espinales (He, 2004). Recientemente se ha demostrado la presencia de periferina en los cuerpos de Bunina típicos de la neuropatología de la ELA esporádica, especulando un posible desbalance entre las diferentes isoformas de periferina en estas inclusiones (Mizuno, 2011). Por último, se han descrito mutaciones del gen de periferina en un pequeño número de pacientes con ELA esporádica (Schymick, 2007).

En nuestro experimento, hemos observado una sobreexpresión de periferina tras la administración de LCR-ELA a los 45 días, siendo por tanto una característica de nuestro modelo que se asemeja a la neuropatología de los pacientes con ELA esporádica. Pero además es interesante resaltar que la expresión de periferina en el grupo LCR-ELA disminuía a niveles de expresión similares a los controles en el grupo de 82 días. Esta curva de expresión de corresponde con la de Akt, y podemos especular que la sobreexpresión

transitoria de periferina podría representar otro mecanismo protector en respuesta al estrés causado por el efecto tóxico del LCR-ELA.

### **9. Se observa TDP43 en el citoplasma de las motoneuronas del grupo tratado LCR-ELA**

La presencia de inclusiones ubiquitinizadas en las motoneuronas supervivientes es una de las características histopatológicas más típicas en ELA, e indican un fallo del proteasoma en la eliminación de proteínas dañadas. El descubrimiento de TDP43 como la principal proteína presente en estas inclusiones en los casos de ELA esporádica y ELA familiar no asociada a SOD1 (Neumann, 2006), y el hecho de que no aparezca en los casos asociados a SOD1 ha llevado a enfatizar el papel de esta proteína en la patogenia de la ELA esporádica (Mackenzie, 2007). Además de la presencia de TDP43 en las inclusiones ubiquitinizadas, se observa un patrón de inmunorreactividad difusa puntiforme en el citoplasma, que podría representar un estadio temprano en la formación de inclusiones. La traslocación de TDP43 de su localización normal en el núcleo al citoplasma es un evento temprano en la patogenia de la ELA, mientras que las inclusiones ubiquitinizadas representarían un estadio más avanzado en la neurodegeneración (Giordana, 2010). En autopsias de pacientes con ELA se ha descrito un mayor número de inclusiones ubiquitinizadas en los casos con menor número de motoneuronas residuales en el asta anterior, que podrían representar el último intento de la neurona para deshacerse de las proteínas deletéreas antes de morir (Leigh, 1991; Van Welsem, 2002).

Al estudiar la inmunorreactividad para TDP43 en nuestro modelo, observamos en el grupo de ratas tratadas con LCR-ELA en el día 45 una traslocación de TDP43 del núcleo al citoplasma en las motoneuronas. También desde el día 45 en este grupo experimental observamos inmunorreactividad para ubiquitina en las motoneuronas. Además encontramos inclusiones en las que colocalizaban TDP43 y ubiquitina. La inmunorreactividad para ubiquitina y TDP43 en inclusiones citoplasmáticas de las motoneuronas aumentaba significativamente a los 82 días.

La presencia de inclusiones inmunorreactivas para TDP43 en nuestro modelo nos sugieren que la vía de neurodegeneración causada por el efecto tóxico del LCR-ELA podría estar relacionada con la de las formas esporádicas de la enfermedad.

#### **10.El grupo tratado con LCR-ELA muestra un aumento de expresión de transferrina y cistatina C**

La transferrina es una glicoproteína plasmática implicada en el transporte de hierro a los tejidos. Es capaz de unir dos átomos de hierro, y en esta situación, tiene una alta afinidad por el receptor de transferrina de las membranas celulares y es internalizada por endocitosis. Las neuronas no sintetizan transferrina, por tanto debe llegar a las neuronas desde el plasma por endocitosis. Se ha encontrado inmunorreactividad para transferrina en los cuerpos de Bunina de pacientes con ELA, y aunque se desconoce el mecanismo por el que la transferrina llega a los cuerpos de Bunina, se ha

especulado que podría deberse a una interacción con cistatina C (Mizuno, 2006).

La cistatina C es una proteína inhibidora de cisteín proteasas, que se expresa en todos los tejidos y es secretada a los fluidos corporales. Se cree que puede estar implicada en regulación de apoptosis, proliferación celular, supervivencia etc. Se ha relacionado con diferentes patologías neurodegenerativas, y se ha observado un aumento de su expresión en respuesta a lesiones del SNC por lo que muchos estudios sugieren un papel neuroprotector (Gauthier, 2011). En los cuerpos de Bunina de los pacientes con ELA se ha encontrado inmunorreactividad para cistatina C (Okamoto, 1993; Okamoto, 2008). Por otro lado, se han objetivado concentraciones reducidas de cistatina C en LCR de pacientes con ELA, y sus niveles se relacionan de forma directa con la supervivencia, indicando de nuevo un posible papel neuroprotector (Wilson, 2010).

En nuestro modelo, observamos una sobreexpresión de cistatina C y transferrina en las ratas tratadas con LCR-ELA a partir del día 45, que aumenta en el día 82. Este hallazgo nos recuerda nuevamente a la neuropatología de los pacientes con ELA esporádica.

### **11.La presencia aumentada de marcadores descritos en los cuerpos de Bunina en el grupo LCR-ELA recuerdan a la histología de SALS**

Los cuerpos de Bunina son uno de los hallazgos neuropatológicos más relevantes en la ELA esporádica, que también se han descrito en pacientes con

FALS no asociada a SOD1 y en DFT-ELA (Kato, 2008). Se encuentran con mayor frecuencia en motoneuronas del asta anterior medular, especialmente lumbar, que en las células de Betz. Están presentes no sólo en motoneuronas en degeneración sino también en las de aspecto normal, lo cual sugiere que es una alteración precoz en las motoneuronas (Okamoto, 2008). Además, no suelen presentar inmunorreactividad para ubiquitina (Leigh, 1991). Junto a ellos, en las motoneuronas en degeneración, aparecen inclusiones con ubiquitina, lo que podría sugerir que representan un mecanismo protector que, una vez superado, podría dar lugar a inclusiones ubiquitinizadas (Van Welsem, 2002; Matías Guiu, 2008). Por otro lado, sólo han sido descritos en motoneuronas, y no en otros elementos celulares como las células gliales, lo cual sugiere una participación, de forma directa o indirecta, en el mecanismo patogénico de la enfermedad (Matías Guiu, 2008).

En nuestro modelo, sin que haya signos de degeneración de las motoneuronas, observamos en el grupo tratado con LCR-ELA una sobreexpresión precoz de cistatina C, transferrina y periferina, todas ellas proteínas presentes en los cuerpos de Bunina (Mizuno, 2006; Okamoto, 1993; Mizuno, 2011). Estos marcadores nos indican que las alteraciones histológicas descritas en nuestro modelo tras la administración continua de LCR-ELA se asemejan a la neuropatología de los pacientes con ELA esporádica.

## **12. Las alteraciones histológicas descritas en el grupo tratado con LCR-ELA comienzan a nivel de médula lumbar**

En la ELA esporádica la degeneración de los tractos corticoespinales es especialmente evidente, sobre todo en los segmentos espinales más bajos (Kato, 2008). En el modelo SOD1 las alteraciones histológicas se observan en los segmentos medulares siendo la neurodegeneración de las motoneuronas inferiores severa mientras que la degeneración de los tractos corticoespinales es media (Del Canto, 1994). Las autopsias de pacientes con FALS asociada a SOD1 mutada también muestran una degeneración del tracto corticoespinal media (Kato, 2008).

En nuestro modelo, las alteraciones histológicas aparecen tanto en motoneuronas superiores como inferiores. Es interesante el hecho de que la sobreexpresión de IBA-1, GFAP y periferina aparece antes en la médula lumbar que en segmentos cervicales o en corteza motora. Además, se observa una mayor densidad de inclusiones de TDP43 y ubiquitina en segmentos medulares lumbares a los 82 días. Estos datos nos hacen sugerir que las alteraciones histológicas causadas por la administración de LCR-ELA podrían comenzar a nivel lumbar. El inicio a nivel de médula lumbar, el segmento espinal más alejado del lugar de administración del LCR-ELA apoya el papel del LCR como medio para la propagación del daño neural en la enfermedad como ya han indicado otros autores (Shaw, 2002).

**13. En el grupo tratado con LCR-ELA se observa un aumento la expresión de proteínas de unión a zinc así como del contenido de zinc**

Diferentes autores han sugerido que la homeostasis del Zn juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la ELA. El Zn en el SNC se encuentra distribuido en 3 compartimentos: una pequeña fracción de ión libre intracelular, en vesículas sinápticas y unida a proteínas, entre ellas las metalotioneínas (Cuajuncgo, 1997). El Zn actúa como un neuromodulador en las sinapsis, participa en la respuesta al estrés oxidativo y vías de apoptosis, en el proceso de mielinización y en la funcionalidad de proteínas relacionadas con el Zn como las metalotioneínas (Mocchegiani, 2005). La implicación del zinc en procesos de estrés oxidativo ha sido propuesto como el mecanismo más relacionado con la neurodegeneración (Frazzini, 2006).

Las metalotioneínas (MT) son unas proteínas de unión a Cu/Zn implicadas en la detoxificación de radicales libres de oxígeno y de metales pesados como el mercurio y cadmio, además de la homeostasis del cobre y zinc, manteniendo su concentración intracelular a niveles adecuados para evitar efectos tóxicos. Existen 4 isoformas, de ellas, MT I y II se encuentran en todos los tejidos, en el SNC principalmente en las células de glía, y MT-III se encuentra principalmente en las neuronas (Mocchegiani, 2005).

Se ha observado un aumento de la expresión de MT en el modelo transgénico SOD1, tanto en motoneuronas como en células gliales, que comienza antes de la aparición de síntomas motores (Gong, 2000b; Tokuda,

2007). Además, si se reduce la expresión de MT en el modelo transgénico SOD1, la progresión de la enfermedad es más rápida (Nagano 2001; Puttaparthi, 2002), mientras que la sobreexpresión de MT-III en motoneuronas del modelo reduce la neurodegeneración, con un enlentecimiento de la progresión de la enfermedad, y un aumento de la supervivencia del roedor (Hashimoto, 2011).

Sin embargo, se ha encontrado una reducción del mRNA de MT-III (Ishigaki, 2002), así como de la expresión de MT-III en la médula espinal de pacientes con ELA esporádica, esta reducción se correlaciona además con la duración de la enfermedad (Hozumi, 2008). Estas diferencias con el modelo animal llevan a especular que MT-III pueda ser una respuesta inicial protectora contra la toxicidad de SOD1 en el modelo FALS, mientras que la reducción de su expresión en la evolución de los pacientes con ELA esporádica tendría un papel en la progresión de la enfermedad (Gong 2000b, Ishigaki, 2002).

En concordancia con esta hipótesis, el hallazgo de un aumento de la expresión de MT en nuestro modelo tras la administración continuada de LCR-ELA, podría ser una respuesta protectora de las motoneuronas ante el efecto tóxico del LCR-ELA.

Además, en nuestro experimento hemos encontrado un aumento del contenido de zinc en el tejido como consecuencia de la administración de LCR-ELA. Los niveles de diferentes metales como zinc, cobre, hierro y magnesio se han encontrado elevados en LCR de pacientes con ELA (Hozumi, 2011). Sin

embargo, otros autores no han encontrado diferencias significativas entre los pacientes con ELA y los controles, aunque un análisis multivariante de los datos sugería que sí podía estar elevado en pacientes mayores de 40 años (Kaniyas, 1997; Kapaki, 1997). En este sentido, para comprobar que el aumento de zinc y MT en tejido en el grupo LCR-ELA no se debía a la administración exógena de zinc en el LCR-ELA, de forma paralela a nuestro experimento, se realizó otro estudio para determinar los niveles de zinc en LCR procedente de pacientes con ELA y controles, sin encontrar diferencias significativas entre ellos (Anexo II). Por tanto, el aumento de expresión de MT y el aumento de zinc en el tejido, encontrados en las ratas tratadas con LCR-ELA, no está mediado por administración exógena de zinc.

**14.Las lesiones histológicas que aparecen en ratas tras la administración prolongada intraventricular de LCR-ELA podría ser un modelo experimental de ELA esporádica**

Nuestro entendimiento actual de la patogenia de la enfermedad están basados ampliamente en el trabajo realizado sobre el modelo animal transgénico con mutaciones de SOD1. Sin embargo, este modelo presenta una serie de limitaciones. En primer lugar como ya se ha descrito existen importantes diferencias en la histología del modelo SOD1 y la SALS, a destacar la ausencia de los característicos cuerpos de Bunina y de las inclusiones TDP 43 típicas de SALS en el modelo SOD1, así como la presencia de vacuolas en el modelo SOD1 que no han sido descritas en autopsias de pacientes (Kato, 2008). En segundo lugar, múltiples estrategias terapéuticas que se mostraron

eficaces en el modelo SOD1 han fracasado en los ensayos clínicos en humanos. Estas diferencias sugieren que las dos formas de la enfermedad podrían tener vías patogénicas diferentes y han llevado a poner en cuestión este modelo.

El desarrollo de modelos basados en TDP43 y FUS, inclusiones típicas de la neuropatología de la ELA esporádica tampoco han conseguido reproducir con fidelidad ni la clínica ni la patología de los pacientes, y la degeneración no es exclusiva de motoneuronas.

Nuestro estudio propone la realización de un modelo experimental de ELA no transgénico sino adquirido, mediante la administración continua intraventricular de LCR procedente de pacientes con ELA, basándonos en los múltiples estudios realizados *in vitro* e *in vivo* que demuestran los efectos citotóxicos sobre las motoneuronas del LCR procedente de estos pacientes (Couratier, 1993; Nagajara, 1994; Rao, 1995; Terro, 1996; Smith, 1998; Shahani 2001; Shahani, 1998; Tikka, 2002; Sen, 2005; Anneser, 2004; Anneser, 2006; Shobba, 2007; Ramamohan, 2007; Gunasekaran, 2009; Vijayalakshmi, 2009; Shobba, 2010; Deepa, 2011; Vijayalakshmi, 2011; Yañez, 2011).

Con nuestro modelo experimental hemos demostrado que la administración continua y prolongada intraventricular de LCR procedente de pacientes con ELA causa lesiones histológicas en las ratas tratadas que no aparecen en las ratas tratadas con LCR procedente de controles no afectados por la enfermedad. La citotoxicidad del LCR procedente de pacientes con ELA

causa alteraciones tisulares con características histoquímicas similares a las encontradas en autopsias de pacientes con ELA esporádica.

En la actualidad carecemos de un modelo experimental de ELA esporádica, que representa al 90% de los pacientes con ELA. Describimos un modelo animal que, a diferencia de los utilizados hasta el momento, presenta lesiones neuropatológicas muy similares a las presentes en ELA esporádica. Por ello, la administración intraventricular de LCR procedente de pacientes con ELA de forma crónica y continuada, durante varias semanas podría representar un modelo animal de ELA esporádica.

### **15. Cuestiones planteadas ante los hallazgos y limitaciones del estudio**

En primer lugar, puesto que el primer objetivo del estudio era comprobar la citotoxicidad del LCR procedente de pacientes con ELA, incluimos LCR procedente de pacientes tanto de ELA esporádica como familiar, siendo los de ambos grupos citotóxicos. En el experimento *in vitro* de Tikka y cols, también observaron una toxicidad similar del LCR procedente de pacientes con ELA esporádica y familiar (Tikka, 2002). Sin embargo, las alteraciones histológicas que hemos encontrado en el grupo de ratas tratadas con LCR-ELA se asemejan a la neuropatología de la ELA esporádica. Nos preguntamos si en ambas formas de la enfermedad, esporádica y familiar, mecanismos fisiopatológicos comunes contribuyen a la propagación del daño de las motoneuronas, aunque el proceso iniciador de la enfermedad sea diferente.

## *Discusión*

En segundo lugar, la evolución de los hallazgos histológicos en el grupo tratado con LCR-ELA en los tres momentos del sacrificio sugiere que hay una progresión de la patología. Nos preguntamos si durante el tiempo de administración el LCR en la bomba de infusión mantiene estable su toxicidad y es necesaria la administración continuada y prolongada de LCR-ELA o si bien una vez que se ha iniciado el proceso de citotoxicidad, las lesiones continuarían progresando hacia la neurodegeneración independientemente de la administración de LCR. Consideramos esta última opción como más probable ya que los animales sacrificados a los 82 días sólo habían recibido infusión de LCR durante 42 días, que era el tiempo asegurado por el volumen de la bomba osmótica que utilizamos, y en este grupo se observa progresión de las alteraciones histológicas con respecto al grupo de 45 días.

En tercer lugar nos preguntamos si concentraciones menores del LCR procedente de los pacientes con ELA causarían también el mismo efecto citotóxico, ya que en nuestro experimento el LCR infundido por la bomba osmótica no estaba diluido. Yañez y cols no encontraron diferencias significativas en la citotoxicidad del LCR-ELA sobre cultivos de motoneuronas utilizando concentraciones de LCR a 10%, 20 % y 50% (Yañez, 2011).

Con respecto a por qué mecanismo tiene lugar el efecto citotóxico y cuál es el factor o factores tóxicos presentes en el LCR de los pacientes con ELA continúan siendo desconocidos. El factor tóxico podría ser liberado en las áreas afectadas al espacio extracelular y por tanto al LCR. Los experimentos de Anneser y cols sugieren que el factor que sustenta el efecto citotóxico debe tener un bajo peso molecular (menor de 5 KDa) y ser resistente al calor

(Anneser, 2006). Muchos autores han apostado por el glutamato como el factor tóxico responsable, a favor de ello va el hecho de que la citotoxicidad del LCR-ELA *in vitro* se haya visto atenuada por la adición de agentes anti-glutamatergicos (Couratier, 1993; Tikka, 2002). Sin embargo, varios hechos van en contra de que el glutamato sea el factor que desencadena el efecto citotóxico: la concentración a la que se encuentra el glutamato en el LCR de pacientes con ELA no produce toxicidad como han demostrado Anneser y cols (Anneser, 2006) y Yañez y cols (Yañez, 2011); por otro lado los resultados con los diferentes antagonistas de glutamato en cuanto a su capacidad de atenuar el efecto citotóxico son dispares y Yañez y cols observaron una ausencia de respuesta al riluzole (Yañez, 2011). Estos argumentos indican que el glutamato por sí solo no sería responsable del efecto citotóxico y el efecto protector de los antagonistas podría deberse a que influyan en el efecto citotóxico de forma colateral. Tanto Yañez y cols (Yañez, 2011) como Sen y cols (Sen, 2005) objetivan un incremento en el calcio citoplasmático en motoneuronas como consecuencia del efecto citotóxico, de forma que, con independencia de quien lo media, en el proceso intervendría el calcio.

Otros potenciales candidatos propuestos como mediadores de la toxicidad son los productos del metabolismo oxidativo ya que se han encontrado concentraciones elevadas de diversos marcadores en LCR de pacientes con ELA (Matías-Guiu, 2010). En esta dirección apuntan los experimentos en cultivos de motoneuronas que demuestran una atenuación de la toxicidad del LCR-ELA con agentes antioxidantes (Terro, 1996; Yañez, 2011), y el hallazgo de que los niveles elevados de 4-hidroxinonal, un producto de peroxidación lipídica, en el LCR-ELA causaban un aumento de la muerte celular (Smith,

1998). Por otro lado, algunos autores indican en el efecto tóxico podrían estar implicados los astrocitos y células microgliales ya que diversas citoquinas se han encontrado elevadas, así como anticuerpos (Matías-Guiu, 2010). Apoyaría este posible mecanismo inmunitario el hallazgo de que la administración de ciclofosfamida (Shahani, 2001) y de minociclina (Tikka, 2002) atenuaban el efecto citotóxico del LCR-ELA sobre los cultivos de motoneuronas.

En la investigación de los factores que pueden mediar el efecto citotóxico del LCR-ELA los estudios de proteómica en el LCR podrían aportar importante información, y ya se han descrito algunas algunas diferencias en LCR-ELA con respecto a controles (Matías-Guiu, 2010).

Para finalizar, creemos que la principal limitación del estudio es la ausencia de manifestaciones clínicas, probablemente por la precocidad del sacrificio. No podemos responder a la cuestión de si el grupo de ratas que fue tratada con LCR-ELA sufrían o no una enfermedad de motoneurona progresiva al momento del sacrificio, ya que no objetivamos manifestaciones clínicas. Sin embargo, la aparición de ondas positivas en la electromiografía en el grupo de 82 días, así como la evolución de los cambios histológicos sugieren una progresividad de las lesiones. A este respecto hemos de añadir que es una observación personal en un nuevo grupo experimental que estamos estudiando actualmente, que al prolongar el seguimiento de las ratas tratadas con LCR-ELA más de 150 días, hemos observado que disminuye el grado de inclinación máxima en el que se mantienen algunas de estas ratas en el plano inclinado, lo que podría indicar el inicio del déficit motor. Sin embargo el estudio aún no ha

## *Discusión*

concluido y los datos todavía no han sido analizados. Especulamos que una extensión del tiempo de infusión y/o del seguimiento de la evolución de la enfermedad, daría lugar a la aparición de manifestaciones clínicas.

## **VI. CONCLUSIONES**



## *Conclusiones*

Después de analizar y discutir los hallazgos de nuestro estudio hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- 1- La administración continua y prolongada intraventricular de LCR procedente de pacientes con ELA en un modelo en rata causa alteraciones histológicas en corteza motora y asta anterior de segmentos medulares alejados del lugar de administración del LCR-ELA que no se observan en los grupos control, sugiriendo que el LCR es el medio de propagación del daño neural.
- 2- En los diferentes momentos del sacrificio, se observa una progresión de las alteraciones histológicas en el grupo tratado con LCR-ELA, siendo el primer cambio objetivado en la arquitectura celular una activación microglial.
- 3- Las alteraciones histológicas y moleculares encontradas tras la administración de LCR-ELA, con presencia en motoneuronas de TDP43 citoplasmática y de proteínas componentes de los cuerpos de Bunina, se asemejan a las descritas en autopsias de pacientes con ELA esporádica.
- 4- La administración prolongada y continua intraventricular en ratas de LCR procedente de pacientes con ELA puede ser el primer modelo experimental específico de ELA esporádica.



## **VII. RESUMEN**



## **I. INTRODUCCIÓN**

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una lesión y muerte selectiva de las motoneuronas en cerebro, tronco cerebral y médula espinal, que causa una pérdida de la función motora progresiva. La mayoría de los casos de ELA son esporádicos (SALS). Aproximadamente un 10% de los casos de ELA tienen historia familiar (FALS) y de ellos, un 20% están asociados a una mutación en la SOD1 (Rosen, 1993). Desconocemos cuáles son las vías patogénicas implicadas en el inicio de la enfermedad y cuál es el mecanismo preciso de la neurodegeneración.

Los datos anatomopatológicos de ELA en humano del los que disponemos provienen de autopsias por lo que representan fases terminales de la enfermedad. Las principales características son una degeneración y pérdida de motoneuronas tanto inferiores del asta ventral medular y tronco del encéfalo como motoneuronas superiores con degeneración del haz corticoespinal. Estas alteraciones se acompañan de astrogliosis (Wijesekera, 2009).

Una característica esencial de la neuropatología de la ELA es la presencia de inclusiones citoplasmáticas, como consecuencia de la agregación de proteínas mal plegadas ubiquitinizadas. En los últimos años se han identificado las proteínas TDP43 (Neumann, 2006) y FUS (Deng, 2010) como los componentes principales de estas inclusiones en pacientes con SALS, DFT y casos de FALS no asociados a SOD1, mientras que no están presentes en los casos asociados a mutaciones de SOD1 (Mackenzie, 2010).

## *Resumen*

El desarrollo de un modelo transgénico de FALS basado en SOD1 mutada ha permitido un extensa área de investigación en la patogénesis de la ELA. Este modelo ha permitido el desarrollo de ensayos terapéuticos, pero desafortunadamente los tratamientos que se han demostrado beneficiosos en los ratones transgénicos no lo han sido cuando se han probado en ensayos clínicos en humanos. Además existen diferencias entre la histopatología de la SALS y la del modelo transgénico SOD1. Los cuerpos de Bunina y las inclusiones de TDP43 típicas de SALS (y de FALS no asociada a SOD1), no están presentes en modelo SOD1. Por otro lado, en el modelo animal SOD1 se objetivan vacuolas que no aparecen en autopsias de ELA en humanos (Kato, 2008).

No existe por tanto un paralelismo completo entre el modelo animal SOD1 y la SALS. Las diferencias clínicas y patológicas indican que posiblemente ambas enfermedades respondan a mecanismos patogénicos diferentes. Estos argumentos han hecho que se cuestione la utilidad del modelo SOD1 y la metodología de investigación en ELA. Otros modelos roedores transgénicos desarrollados posteriormente para TDP43 (Zhou, 2010) y FUS (Huang, 2011), tampoco reflejan a los pacientes con SALS. Sería fundamental encontrar un modelo animal que represente a la mayoría de los pacientes con ELA, para un mejor entendimiento de la patogenia de la enfermedad y sobre todo para el estudio de potenciales fármacos para su tratamiento.

El patrón de progresión clínica de la ELA sugiere una propagación del daño neural desde una región afectada a las motoneuronas adyacentes, quizá por una difusión de agentes tóxicos de un área a otra a través del LCR (Shaw,

2002). Por ello se han llevado a cabo múltiples experimentos para comprobar si el LCR procedente de pacientes con ELA tiene propiedades tóxicas sobre las motoneuronas.

Diversos autores han objetivado efecto citotóxico del LCR-ELA sobre cultivos de motoneuronas, causando una reducción de su supervivencia (Couratier, 1993; Terro, 1996; Smith, 1998; Tikka, 2002; Sen, 2005; Anneser, 2006; Vijayalakshmi, 2009; Yañez, 2011). De forma paralela se han realizado experimentos que han demostrado este efecto citotóxico el LCR-ELA sobre motoneuronas en un modelo *in vivo* en el que se realizaba una inyección intratecal puntual de LCR-ELA en ratas y eran sacrificadas 48 horas más tarde. Ambos modelos han demostrado que LCR-ELA tiene la capacidad de producir alteraciones patológicas sobre las motoneuronas, tales como aumento de neurofilamentos fosforilados (Rao, 1995; Nagajara, 1994; Shahani 2001 Vijayalakshmi, 2009; Deepa, 2011), proliferación de células microgliales (Tikka, 2002) y astrocitos (Shahani, 1998; Anneser, 2004) con sobreexpresión de GFAP y S100 $\beta$  (Shobba, 2010), aumento del calcio intracelular (Sen, 2005; Yañez, 2011), reducción de la expresión de GLT-1 (Shobba, 2007), modificaciones en canales iónicos (Gunasekaran, 2009), fragmentación del Golgi (Ramamohan, 2007), estrés de retículo endoplásmico (Vijayalakshmi, 2011), y baja expresión de factores neurotróficos (Deepa, 2011).

Basándonos en este efecto tóxico en el LCR-ELA, nos planteamos la hipótesis de que la administración continua mediante infusión intraventricular de LCR de pacientes con ELA en ratas causaría una degeneración neuronal y podría ser un modelo experimental de ELA.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se obtuvieron muestras de LCR de 7 pacientes diagnosticados de ELA según los criterios de El-Escorial-Arlie (Brooks, 2000). Las muestras de LCR fueron recogidas mediante punción lumbar cuando existía una indicación clínica, como parte del estudio rutinario del paciente, bajo consentimiento informado del paciente. La edad media de los pacientes era de 54,2 años. Tres eran casos familiares y cuatro casos esporádicos. Tres de los pacientes presentaron inicio espinal, tres pacientes presentaron inicio bulbar y uno de los pacientes tenía síntomas en ambas localizaciones. Cuatro casos tenían una evolución de la enfermedad igual o menor a 6 meses y tres eran casos de larga evolución. Como LCR-control se utilizaron muestras procedentes de pacientes con enfermedades no neurodegenerativas ni infecciosas que habían requerido de la realización de una punción lumbar para examen rutinario, bajo consentimiento informado del paciente.

Se utilizaron 28 ratas Wistar con edades comprendidas entre 1 y 5 meses, distribuidas en tres grupos experimentales, uno al que se administró LCR-control, otro LCR-ELA y un tercer grupo de ratas a las que se infundió SSF. Se realizó una intervención quirúrgica para la implantación de una minibomba osmótica que infundía el LCR-ELA, LCR-control o SSF en el ventrículo lateral derecho de la rata de forma continuada durante 42 días.

En cada uno de los grupos experimentales el tiempo de observación de las ratas hasta el sacrificio programado fue de 20, 45 y 82 días.

Las variables clínicas observadas fueron el peso del animal, y la evaluación de la función motora mediante el test del plano inclinado y la escala de Matsumoto. Ambos test se utilizaron en la evaluación del modelo transgénico SOD1 G93A en ratas (Matsumoto, 2006). Se exploró a los animales al menos una vez por semana, siendo el explorador ciego. Además se realizó un electromiograma a las ratas, evaluando la presencia de actividad espontánea.

Tras el sacrificio y extracción de cerebros y médulas espinales de los animales se realizaron secciones de segmentos espinales cervicales y lumbares así como de corteza motora. Las secciones se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-IBA1, anti-MHC-II, anti-GFAP, anti-S100 $\beta$ , anti GLT-1, anti-Caspasa3, anti-Akt Pan, anti-Akt Phos, anti-TARDBP, anti-Ubiquitina, anti-Periferina, anti-Transferrina, anti-Cistatina C, anti-Metalotioneína y anti- Colin acetiltransferasa. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente ligado a fluoróforos. Las imágenes de inmunofluorescencia se obtuvieron con un microscopio confocal Olympus AF1000. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPadPrism.

Además se realizó una determinación de zinc en las secciones mediante espectrometría de absorción atómica de llama.

### **III. RESULTADOS**

#### **- Variables clínicas y neurofisiológicas**

No se encontraron diferencias significativas en las evaluaciones clínicas de los tres grupos experimentales, ni en el peso, ni en el test del plano

inclinado ni en la escala de Matsumoto. En el estudio electromiográfico, se observaron ondas positivas en 4 de las ratas del grupo tratado con LCR-ELA sacrificado a los 82 días.

#### **- Estudio neuropatológico**

Encontramos una serie de alteraciones patológicas en el grupo de ratas tratado con LCR-ELA que no aparecieron en los grupos control:

- *Activación microglial:* En el grupo LCR-ELA se observó ya desde los 20 días post-implantación una discreta sobreexpresión del marcador IBA-1 que se hacía evidente a los 45 días en todos los segmentos estudiados. En este grupo las células microgliales mostraban una morfología activada, con cuerpos celulares elongados con prolongaciones más gruesas a los 20 días, y un aspecto ameboide indicativo de un estado activado fagocítico a los 45 y 82 días y se encontraban en estrecho contacto con las motoneuronas en el asta anterior. Además las células de microglía expresaban MHC-II, marcador de estado inflamatorio, desde el día 20 en todos los segmentos estudiados, intensificándose a los 45 y 82 días.
- *Respuesta astrocitaria:* La respuesta astrocitaria en el grupo tratado con LCR-ELA se hizo evidente a los 45 días postimplantación, con sobreexpresión de GFAP en la vecindad de las motoneuronas, además se observó una sobreexpresión de S100 $\beta$  y de GLT-1 en este grupo.
- De especial interés es resaltar que mientras que a los 20 días ya se observaban discretos cambios morfológicos de las células microgliales y sobreexpresión de MHC-II, la respuesta astrocitaria con sobreexpresión de GFAP no apareció hasta el día 45 postimplantación.

- *Expresión de caspasa 3:* Al analizar la expresión de caspasa 3, se observó que estaba aumentada en todas las áreas estudiadas en el grupo LCR-ELA desde el día 20 y especialmente en los 45 y 82 días, indicador de puesta en marcha de mecanismos de apoptosis.
- *Expresión de marcadores anti-apoptóticos:* Se observó una expresión de Akt hasta 3 veces superior en el grupo LCR-ELA a los 45 días frente a los otros grupos experimentales, que volvía a niveles similares a los otros grupos en el día 82.
- *Expresión de periferina:* En el grupo LCR-ELA se observó un aumento de la expresión de periferina a los 45 días, que volvía a niveles similares a los otros grupos experimentales en el día 82 postimplantación. Las células con mayor inmunoreactividad para periferina también presentaban inmunoreactividad para Akt.
- *Expresión de ubiquitina y TDP43:* Observamos una traslocación de TDP43 al citoplasma de las motoneuronas, proteína estrechamente relacionada con las formas esporádicas de ELA, en el grupo LCR-ELA a los 45 y 82 días postimplantación. También se observó un aumento de ubiquitina en este grupo.
- *Expresión de cistatina C y transferrina:* Encontramos un aumento de la expresión de cistatina C y transferrina, a los 45 y 82 días en el grupo LCR-ELA.
- *Expresión de metalotioneína (MT) y contenido de zinc:* Observamos un aumento de la expresión de metalotioneína en el grupo LCR-ELA a los 45 y 82 días. Por otro lado, el contenido de zinc en las secciones de las ratas tratadas con LCR-ELA era mayor que el de los otros grupos.

#### **IV. DISCUSIÓN**

Múltiples estudios han demostrado un efecto citotóxico del LCR-ELA, con aparición de lesiones patológicas en el asta anterior medular tras una inyección puntual intratecal en ratas de LCR procedente de pacientes con ELA. En nuestro experimento hemos demostrado que la administración intraventricular continua y prolongada de LCR-ELA provoca la aparición de lesiones histológicas en corteza motora y asta anterior medular cervical y lumbar.

Los primeros cambios en la arquitectura celular que observamos en el grupo tratado con LCR-ELA son una activación microglial a los 20 días seguida de astrogliosis a los 45 días. Las primeras alteraciones moleculares observadas son una sobreexpresión de periferina y de Akt en el día 45, que disminuyen en el día 82, cuando se hace más evidente un aumento de las inclusiones citoplasmáticas de TDP43 y ubiquitina así como Cistatina C y transferrina.

Además, las alteraciones observadas se iniciaron a nivel de médula lumbar, el segmento espinal más alejado del lugar de administración del LCR-ELA, lo cual apoya el papel del LCR como medio para la propagación del daño neural (Shaw, 2002).

Sin embargo, a lo largo durante el periodo de observación no se encontraron diferencias significativas en las variables clínicas evaluadas. Comparándolo con otros modelos, era poco previsible encontrar alteraciones clínicas por el tiempo de evolución. Así, en el ratón transgénico SOD1 G93A el déficit motor comienza a los 90-100 días (Kato, 2008). Probablemente las

manifestaciones clínicas en nuestro modelo sean más tardías y no hayan sido detectadas por la precocidad del sacrificio. Desde el punto de vista neurofisiológico, se observaron discretas alteraciones electromiográficas, con aparición de ondas positivas en las ratas del grupo LCR-ELA sacrificado a los 82 días que podrían indicar una lesión de las motoneuronas.

#### **- Activación microglial y respuesta astrocitaria**

Tanto en autopsias de pacientes con ELA (Henkel, 2004) como en el modelo SOD1 (Henkel, 2006) se ha observado una activación de las células de microglía que además contribuye a la progresión de la enfermedad en el modelo transgénico (Beers, 2006; Boillee, 2006). En concordancia con estos datos, en nuestro modelo hemos observado un aumento de las células de microglía marcadas con IBA-1, que presentan cambios morfológicos indicativos de activación fagocítica, así como expresión de MHC-II como marcador de un estado inflamatorio. Estos cambios aparecen sólo en las ratas tratadas con LCR-ELA y son precoces, observándolos a partir del día 20 postimplantación.

La degeneración neural en ELA se acompaña de una astrogliosis reactiva. En nuestro modelo hemos observado en las ratas tratadas con LCR-ELA una sobreexpresión de GFAP a partir del día 45. GFAP es el principal filamento intermedio de los astrocitos, su sobreexpresión es indicativa de astrogliosis reactiva, y se ha descrito en autopsias de pacientes con ELA (Fujita, 1998) así como en los modelos en ratas con administración puntual intratecal de LCR-ELA (Shahani, 1998; Shobha, 2010).

Además en pacientes con ELA se observa de una sobreexpresión de S100 $\beta$ , proteína de unión al calcio implicada en múltiples funciones celulares (Migheli, 1999). De forma similar, en nuestro modelo, las ratas tratadas con LCR-ELA presentaban una sobreexpresión de S100 $\beta$  a partir del día 45 postimplantación.

El transportador GLT-1 astrocitario encargado de recaptar el glutamato extracelular, se ha encontrado disminuido en pacientes con ELA (Rothstein, 1995) así como en el modelo SOD1 (Vargas, 2010). Nosotros sin embargo hemos observado un aumento de la expresión de GLT-1 tras la administración intraventricular prolongada de LCR-ELA, en los días 45 y 82 postimplantación probablemente como una expresión más de astrogliosis reactiva.

De especial interés es destacar que en nuestro modelo la activación microglial precede a la respuesta astrocitaria que no aparece hasta los 45 días. Estos hallazgos van en la misma línea que otros estudios en el modelo SOD1 que observan una activación microglial en estadios presintomáticos, mientras que la respuesta astrocitaria aparece más tarde cuando ya es evidente la clínica motora (Alexianu, 2001; Graber, 2010). Estos resultados apoyan la hipótesis de un mecanismo neuroinflamatorio como un evento temprano en la patogenia de la ELA.

#### **- Expresión de marcadores de apoptosis**

Existen múltiples evidencias de la puesta en marcha de las vías de apoptosis en ELA (Sathasivam, 2005; Matías-Guiu, 2008). En nuestro modelo observamos una sobreexpresión precoz de caspasa 3 indicativo de activación de vías apoptóticas como consecuencia de la toxicidad del LCR-ELA.

Las ratas tratadas con LCR-ELA además mostraban un aumento de la expresión de Akt y su forma activa Akt fosforilada, proteínas anti-apoptóticas implicadas en la supervivencia celular (Zhou, 2000). El aumento era transitorio a los 45 días, volviendo a niveles normales a los 82 días. En el modelo SOD1 se ha observado una disminución de la expresión de Akt (Warita, 2001; Nagano, 2002; Dewil, 2007) así como en autopsias de ELA en humanos (Dewil, 2007). Nuestra hipótesis es que la activación de Akt de forma precoz, representa una respuesta inicial que trata de ser protectora ante el estrés causado por la toxicidad del LCR-ELA.

#### **- Expresión de periferina**

La periferina es una proteína de los filamentos intermedios de tipo III cuya expresión puede aumentar en respuesta a determinados estímulos de daño neural. Se han encontrado agregados citoplásmicos de periferina en el modelo SOD1 así como en pacientes con ELA (Robertson, 2003; Mc Lean, 2010), y recientemente se ha demostrado la presencia de periferina en los cuerpos de Bunina típicos de la neuropatología de la SALS (Mizuno, 2011). En nuestro modelo hemos observado una sobreexpresión de periferina tras la administración de LCR-ELA a los 45 días, siendo por tanto una característica que se asemeja a la neuropatología de los pacientes con SALS. Además, de forma similar a la curva de expresión de Akt, la expresión de periferina disminuía a niveles similares a los controles a los 82 días. Por ello especulamos que podría representar otro mecanismo protector en respuesta al estrés causado por el efecto tóxico del LCR-ELA.

### **- TDP43 y ubiquitina citoplasmáticas**

Las inclusiones ubiquitinizadas en las motoneuronas es una de las características histopatológicas más típicas en ELA, indicando un fallo del proteasoma en la eliminación de proteínas dañadas. En SALS se ha descrito la proteína TDP43 como el principal componente de estas inclusiones (Neumann, 2006) y la traslocación de TDP43 de su localización normal en el núcleo al citoplasma es un evento temprano en la patogenia de la ELA (Giordana, 2010). En nuestro modelo hemos observado inmunorreactividad para ubiquitina y TDP43 en el citoplasma de las motoneuronas de las ratas tratadas con LCR-ELA a los 45 y 82 días, apoyando la asociación de nuestro modelo con las formas esporádicas de ELA.

### **- Expresión de transferrina y cistatina C**

Las proteínas transferrina y cistatina C se han descrito como componentes de los cuerpos de Bunina típicos de SALS (Okamoto, 2008; Mizuno, 2006). Hemos observado una sobreexpresión de cistatina C y transferrina en las ratas tratadas con LCR-ELA a los 45 y 82 días. Este hallazgo nos recuerda nuevamente a la neuropatología típica, con cuerpos de Bunina, de la SALS.

### **- Expresión de proteínas de unión a zinc**

Algunos estudios sugieren una homeostasis anormal del zinc en ELA (Mocchegiani, 2005). En el modelo SOD1, se ha observado una sobreexpresión de MT, proteína de unión a Zn, desde estadios presintomáticos (Gong, 2000b; Tokuda, 2007). Sin embargo, en SALS la expresión de MT está

disminuida, y se correlaciona con la duración de la enfermedad, por lo que se especula que la sobreexpresión de MT trata de ser una respuesta inicial protectora que disminuye con la progresión de la enfermedad (Hozumi, 2008). A favor de esta hipótesis van nuestros resultados, con una sobreexpresión precoz de MT en el grupo tratado con LCR-ELA a partir de los 45 días. Además, hemos encontrado un aumento del contenido de zinc en el tejido en este grupo.

## **V. CONCLUSIONES**

En nuestro experimento hemos demostrado que la administración continua intraventricular de LCR procedente de pacientes con ELA causa lesiones histológicas en corteza motora y asta anterior medular en las ratas tratadas que no aparecen en los controles, y que además son similares a las observadas en los pacientes con ELA esporádica. Por ello, la administración crónica intraventricular en ratas de LCR procedente de pacientes con ELA podría representar un modelo experimental de ELA esporádica.



## **VIII. SUMMARY**



## **I. INTRODUCTION**

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by progressive muscular paralysis reflecting degeneration of motor neurons in the primary motor cortex, corticospinal tracts, brainstem and spinal cord. Most cases of ALS are sporadic (SALS), and about 10% of cases have a family history of ALS (FALS). Approximately 20% of FALS cases are associated with mutations in the Copper-Zinc superoxide dismutase (SOD1) gene (Rosen, 1993). The exact molecular pathways causing motor neuron degeneration are still unknown.

The pathological hallmarks of ALS are the degeneration and loss of upper and lower motor neurons with astrocytic gliosis and the presence of cytoplasmic inclusions in degenerating neurons and glia (Wijesekera, 2009). Recently, the DNA/RNA binding proteins TDP43 (Neumann, 2006) and FUS (Deng, 2010) have been identified as the main components of these inclusions in patients with SALS, frontotemporal dementia (FTD), and FALS cases not associated with SOD1 mutations (Mackenzie, 2010).

The development of a transgenic model based in mutant SOD1 has shed much light on the pathomechanisms of the motor neuron degeneration and permitted the development of different therapeutic trials. Unfortunately, those treatments that showed beneficial effects for SOD1 transgenic mice were not helpful for human in clinical trials. Furthermore, some human SALS cytopathological features including Bunina bodies and TDP43 inclusions are not present in the mutant SOD1 model. Transgenic rodents exhibit vacuoles in neurons, and this feature is not evident in human ALS autopsies (Kato, 2008).

## *Summary*

The clinical and cytopathological differences between mutant SOD1 model and SALS suggest that the pathomechanism could be different in each disease. These arguments have questioned the usefulness of the SOD1 model and the research methodology in ALS. Other transgenic rodent models investigated for TDP43 (Zhou, 2010) and FUS (Huang, 2011) do not represent SALS patients either. It would be essential to find an animal model that represents the majority of ALS patients, to get a better understanding of the disease pathogenesis and particularly to study potential treatments.

The clinical progression pattern in ALS suggests propagation of neuronal injury between adjacent groups of motor neurons. Diffusible toxic factors may contribute to this propagation and they could be detectable in cerebrospinal fluid (CSF) (Shaw, 2002). There have been several studies that demonstrate the toxicity to neurons in culture of the CSF from ALS patients (Couratier, 1993; Terro, 1996; Smith, 1998; Tikka, 2002; Sen, 2005; Anneser, 2006; Vijayalakshmi, 2009; Yañez, 2011). In addition, some experiments have demonstrated this ALS-CSF toxic effect for motor neurons after the injection of CSF samples from ALS and non-ALS patients into the spinal subarachnoid space of three day old rat pups sacrificed 48 hours after the injection. Both models have shown that ALS-CSF is able to generate pathologic changes on motor neurons such as neurofilament phosphorylation (Rao, 1995; Nagajara, 1994; Shahani 2001 Vijayalakshmi, 2009; Deepa, 2011), microglia proliferation (Tikka, 2002), astrogliosis (Shahani, 1998; Anneser, 2004) with GFAP and S100 $\beta$  overexpression (Shobba, 2010), intraneural calcium elevation (Sen, 2005; Yañez, 2011), altered GLT-1 expression (Shobba, 2007), altered ionic channel expression (Gunasekaran, 2009), Golgi fragmentation (Ramamohan,

2007), endoplasmic reticular stress (Vijayalakshmi, 2011), and down regulation of trophic factors (Deepa, 2011).

Considering the described ALS-CSF toxic effect, we had the hypothesis that continuous intraventricular infusion of CSF from ALS patients in rats would induce neural degeneration and could represent an ALS experimental model.

## **II. METHODS**

CSF samples were collected by lumbar puncture from 7 ALS diagnosed patients according to El Escorial-Arlie diagnostic criteria (Brooks 2000). CSF samples were collected for routine clinical examination with informed consent from the patient. Three of the patients were FALS cases and four were SALS cases. Three of the patients had bulbar-onset symptoms, three had a spinal form and one patient had symptoms from both at disease onset. Four patients were at an initial stage of the disease at the time of CSF collection (less than 6 months from first symptoms), and three patients had a long disease evolution. We used as controls (non-ALS-CSF) 7 patients suffering from other neurological symptoms such as headache, who required lumbar puncture for their routine examination.

We used 28 Wistar male rats between 1 and 5 months old. We performed a surgical procedure for the implantation of an osmotic mini-pump for the infusion of non-ALS-CSF, ALS-CSF or physiological saline solution into the rat's lateral ventricle. The reservoir volume of the pump assured continuous CSF pumping for 42 days. Three experimental groups were designed for the study: the first received non-ALS-CSF, the second received ALS-CSF and the last one

## *Summary*

received saline solution. In every group rats were observed for 20 days, 45 days or 82 days until the programmed day for sacrifice. All the procedures were carried out following the guidelines for human and animal investigation by the Spanish Ethical Committees and European Union normative.

Clinical assessments included body weight and motor evaluation with inclined plane test and Matsumoto motor score. Both motor tests were used in the evaluation of the SOD1 G93A transgenic rat model (Matsumoto, 2006). Animals were tested at least once a week and the examiner was blind. An electromyogram was performed to evaluate denervation signs.

After sacrifice, brains and spinal cords were extracted. Motor cortex and cervical and lumbar spinal cord sections were cut. Sections were incubated with the following primary antibodies: anti-IBA1, anti-MHC-II, anti-GFAP, anti-S100 $\beta$ , anti-GLT-1, anti-Caspase3, anti-Akt Pan, anti-Akt Phos, anti-TARDBP, anti-ubiquitin, anti-peripherin, anti-transferrin, anti-cystatin C, anti-metallothionein and anti-choline acetyltransferase. Subsequently sections were incubated with the corresponding labeled secondary antibodies. Immunofluorescence images were acquired with Olympus AF1000 confocal microscope. Data were processed using GraphPadPrism software. Finally, tissue zinc was determined by electrothermal atomic absorption spectrometry.

### **III. RESULTS**

#### **- Clinical and neurophysiological assessments**

We did not find significant differences between the three experimental groups in the clinical evaluations body weight, inclined plane test and

## Summary

Matsumoto score. Regarding the electromyography study, positive waves were observed in four of the rats that received ALS-CSF sacrificed at 82 days.

### - Neuropathological study

Some pathological changes were evident in the ALS-CSF group and these changes were not observed in the other experimental groups:

- *Microglial activation:* In the ALS-CSF group mild IBA-1 overexpression was observed since 20 days post-implantation and became evident at 45 days in all the studied sections. In this group microglial cells showed an activated morphology with elongated cells bodies and long and thick processes at 20 days, while ameboid cells indicating a fagocitic cellular activation were found at 45 and 82 days. These cells were in close contact to motor neurons in the spinal anterior horn. Furthermore, microglial cells expressed MHC-II, a marker of inflammatory stages from day 20, and it was more pronounced at 45 and 82 days.
- *Astrocytic activation:* In the ALS-CSF group GFAP overexpression was evident from day 45 post-implantation. In addition, S100 $\beta$  and GLT-1 overexpression was observed in this group. These markers indicate astrocytic activation.
- Remarkably, while in the group sacrificed at day 20 post-implantation some morphological changes and MHC-II overexpression were already observed in microglial cells, astrocytic activation with GFAP overexpression was not evident until 45 days post-surgery.

## Summary

- *Caspase 3 expression:* Caspase 3 was overexpressed in all the sections studied in the ALS-CSF group since day 20 and especially at days 45 and 82 post-implantation, indicating activation of apoptosis mechanisms.
- *Anti-apoptotic markers expression:* An overexpression of Akt was evident in the ALS-CSF group compared to the other experimental groups at 45 days. Akt expression in ALS-CSF group returned to similar levels to those of the control groups at 82 days post-implantation.
- *Peripherin expression:* At 45 days post-surgery an overexpression of peripherin was observed in the ALS-CSF group. The expression of peripherin in this group returned to similar levels to those of the control groups at 82 days. Cells with high peripherin immunoreactivity were also overexpressing Akt.
- *Ubiquitin and TDP43 expression:* TDP43 cytoplasmic immunoreactivity was observed in motor neurons in the ALS-CSF group at 45 and 82 days post-implantation. TDP43 is closely related to sporadic forms of ALS. Ubiquitin overexpression was also found in the ALS-CSF group.
- *Cystatin C and Transferrin:* In the ALS-CSF group cystatin c and transferrin overexpression was found at 45 and 82 days post-implantation.
- *Metallothionein and Zinc:* An overexpression of the zinc-binding protein metallothionein was observed at 45 and 82 days post-implantation in the ALS-CSF group. Tissue zinc was also elevated in the motor cortex sections of this group.

#### **IV. DISCUSSION**

There have been many experiments that demonstrate the ALS-CSF cytotoxic effect causing cytopathologic changes of the spinal ventral horn neurons in rat pups after a punctual intrathecal injection. In our experiment we demonstrate that continuous and prolonged intraventricular ALS-CSF infusion in rats causes cytopathologic lesions of the motor cortex, and ventral horn neurons in the cervical and lumbar spinal cord.

The first changes in the cellular architecture observed were microglial activation at 20 days, followed by astrogliosis at 45 days post-surgery. The first molecular changes were peripherin and Akt overexpression at 45 days. At 82 days peripherin and Akt returned to control levels while cytoplasmic inclusions with TDP43, ubiquitin, cystatin C and transferrin immunoreactivity became more evident.

Furthermore, the histopathological changes were observed first in the lumbar spinal cord sections, the most distant area from the site where ALS-CSF was administered. This fact supports the idea that neural damage in ALS is propagated through CSF (Shaw, 2002).

Nevertheless, we did not find differences in the rat clinical assessments along the study. If we compare our model with other rodent models it was not probable to find clinical symptoms in such a short time of evolution. The first clinical symptom of G93A SOD1 mice appears at approximately 90 to 100 days of age (Kato, 2008). Presumably clinical symptoms in our model would appear later in time and were not detected because of the early sacrifice. The mild

## *Summary*

electromyographic changes with positive waves observed in the ALS-CSF group could also indicate motor neuron damage.

### **- Microglial and astrocytic activation**

Microglial activation has been demonstrated in human ALS autopsies (Henkel, 2004) as well as in SOD1 mutant mice (Henkel, 2006). It correlates with progression of the disease in SOD1 mutant mice (Beers, 2006; Boillee, 2006). Similarly we observed in the ALS-CSF group an increased IBA-1 immunoreactivity, morphological microglial changes and MHC-II expression in the activated microglial cells. These changes took place at initial phases, since day 20 post-surgery.

Reactive astrogliosis surrounds degenerating motor neurons in ALS. In our experiment we observed GFAP overexpression in the rats that received ALS-CSF since day 45 post-surgery. GFAP is the major protein of intermediate filaments in astrocytes and its overexpression denotes reactive astrogliosis. GFAP overexpression was evidenced in ALS patients (Fujita, 1998) and in the rat model with punctual intrathecal ALS-CSF injection (Shahani, 1998; Shobha, 2010). Additionally, S100 $\beta$  overexpression has also been observed in ALS patients (Migheli, 1999). S100 $\beta$  is a calcium-binding protein that participates in many cellular pathways. In our model we demonstrated S100 $\beta$  overexpression in ALS-CSF rats at 45 days post-surgery.

The GLT-1 glutamate glial transporter that removes glutamate from the extracellular space has been found diminished in ALS patients (Rothstein, 1995) and ALS mice model (Vargas, 2010). However, we found an

## *Summary*

overexpression of GLT-1 in the rats that received ALS-CSF at 45 and 82 days post-surgery, probably as one more sign of reactive astrogliosis.

An interesting fact about our model is that microglial activation precedes reactive astrogliosis. This finding goes in accordance with other studies that demonstrate in mutant SOD1 mice early microglial activation before clinical onset, while increased astrogliosis occurs later in the disease process (Alexianu, 2001; Graber, 2010). This suggests that microglia may represent an early immune-inflammatory event in ALS pathogenesis.

### **- Apoptosis markers expression**

There is increasing evidence that a programmed mechanism of cell death resembling apoptosis is responsible for motor neuron degeneration in ALS (Sathasivam, 2005; Matías-Guiu, 2008). In our model we observed an early overexpression of caspase 3 that implies apoptosis activation as a consequence of ALS-CSF toxicity.

The group of rats which received ALS-CSF also showed an increased expression of Akt and its active form phospho-Akt. These are antiapoptotic proteins that play a role in cell survival (Zhou, 2000). Akt overexpression was transient, only evidenced at 45 days post-surgery and returning to basal levels at 82 days. Conversely, decreased Akt expression has been described in mutant SOD1 mice (Warita, 2001; Nagano, 2002; Dewil, 2007) and ALS patients (Dewil, 2007). We propose that early Akt activation in our model represents an initial neuroprotective mechanism in response to the stress generated by ALS-CSF toxicity.

**- Peripherin expression**

Peripherin is a type III intermediate filament protein which can be overexpressed in response to neural damage. Peripherin cytoplasmic aggregates have been observed in mutant SOD1 mice and ALS patients (Robertson, 2003; Mc Lean, 2010). Recently, peripherin has been localized in Bunina bodies which are typically found in SALS patients (Mizuno, 2011). In our model we observed peripherin overexpression in the ALS-CSF group of rats at 45 days post-surgery. Therefore, this is a feature of our model that resembles SALS patients' neuropathology. Peripherin expression curve is similar to Akt, returning to basal levels at 82 days. Thus, we speculate peripherin could also represent a neuroprotective mechanism.

**- Cytoplasmic TDP43 and ubiquitin**

The neuropathological hallmark of ALS is the intracytoplasmic accumulation of ubiquitinated aggregates in motor neurons. Recently, TDP43 has been identified as a component of these inclusions in ALS and FTD (Neumann, 2006). The redistribution of TDP43 from its normal location in the nucleus to the cytoplasm is an early event in ALS pathogenesis (Giordana, 2010). In our experiment, we observed cytoplasmic ubiquitin and TDP43 immunoreactivity in motor neurons in the group of rats that received ALS-CSF at 45 and 82 days post surgery. This feature supports the idea that our model resembles sporadic forms of ALS.

**- Transferrin and cystatin C expression**

Transferrin and cystatin C have been localized in Bunina bodies in SALS patients (Okamoto, 2008; Mizuno, 2006). We observed increased immunoreactivity for cystatin C and transferrin in the cytoplasm of motor neurons in the group of rats that received ALS-CSF at 45 and 82 days. This finding also resembles the typical SALS neuropathology with Bunina bodies.

**- Zinc-binding proteins expression**

Some studies suggest abnormal zinc homeostasis in ALS (Mocchegiani, 2005). Metallothionein (MT), a zinc-binding protein is overexpressed in mutant SOD1 mice before clinical onset (Gong, 2000b; Tokuda, 2007) while MT expression in SALS is decreased and correlates with disease evolution. Thus, it is speculated that MT overexpression may serve as an early protective response that decreases with disease progression (Hozumi, 2008). Accordingly we observed early MT overexpression in the ALS-CSF group at 45 days.

**V. CONCLUSIONS**

In this study we demonstrate that continuous and prolonged intraventricular ALS-CSF infusion in rats induces cytopathological changes in motor cortex and spinal anterior horn that do not appear in control groups. These changes resemble the neuropathology of SALS patients. Therefore, sustained ALS-CSF intraventricular administration in rats could represent an experimental model for sporadic forms of ALS.



## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



## *Bibliografia*

Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology* 2001;57:1282–9.

Amendola J, Verrier B, Roubertoux P, Durand J. Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 2004;20:2822–6.

Andersen PM. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2006;6:37–46.

Anneser JMH, Chahli C, Ince PG, Borasio GD, Shaw PJ. Glial proliferation and metabotropic glutamate receptor expression in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:831–40.

Anneser JMH, Chahli C, Borasio GD. Protective effect of metabotropic glutamate receptor inhibition on amyotrophic lateral sclerosis-cerebrospinal fluid toxicity in vitro. *Neuroscience* 2006;141:1879–86.

Atkin JD, Farg MA, Walker AK, McLean C, Tomas D, Horne MK. Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2008;30:400–7.

Beaulieu J-M, Nguyen MD, Julien J-P. Late Onset Death of Motor Neurons in Mice Overexpressing Wild-Type Peripherin. *J Cell Biol* 1999;147:531–44.

Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, et al. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006;103:16021–6.

## *Bibliografía*

Beers DR, Zhao W, Liao B, Kano O, Wang J, Huang A, et al. Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain Behav Immun* 2011;25:1025–35.

Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 2006;312:1389–92.

Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:293–9.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, et al. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 2003;302:113–7.

Couratier P, Hugon J, Sindou P, Vallat JM, Dumas M. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet* 1993;341:265–8.

Dal Canto MC, Gurney ME. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 1994;145:1271–9.

Deepa P, Shahani N, Alladi PA, Vijayalakshmi K, Sathyaprabha TN, Nalini A, et al. Down regulation of trophic factors in neonatal rat spinal cord after administration of cerebrospinal fluid from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neural Transm* 2011;118:531–8.

## *Bibliografia*

Deng H-X, Zhai H, Bigio EH, Yan J, Fecto F, Ajroud K, et al. FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2010;67:739–48.

Dewil M, Lambrechts D, Sciot R, Shaw PJ, Ince PG, Robberecht W, et al. Vascular endothelial growth factor counteracts the loss of phospho-Akt preceding motor neurone degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007;33:499–509.

Duchen LW, Strich SJ. An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant “wobbler.” *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1968;31:535–42.

Durand J, Amendola J, Bories C, Lamotte d’Incamps B. Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol Paris* 2006;99:211–20.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 2000;25:1439–51.

Frazzini V, Rockabrand E, Mocchegiani E, Sensi SL. Oxidative stress and brain aging: is zinc the link? *Biogerontology* 2006;7:307–14.

Fujita K, Kato T, Yamauchi M, Ando M, Honda M, Nagata Y. Increases in fragmented glial fibrillary acidic protein levels in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res* 1998;23:169–74.

Gauthier S, Kaur G, Mi W, Tizon B, Levy E. Protective mechanisms by cystatin C in neurodegenerative diseases. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011;3:541–54.

## *Bibliografia*

Giordana MT, Piccinini M, Grifoni S, De Marco G, Vercellino M, Magistrello M, et al. TDP-43 redistribution is an early event in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* 2010;20:351–60.

a)Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 2000;20:660–5.

b)Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL. Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 2000;20:660–5.

Gordon PH, Moore DH, Miller RG, Florence JM, Verheijde JL, Doorish C, et al. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet Neurol* 2007;6:1045–53.

Graber DJ, Hickey WF, Harris BT. Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* 2010;7:8.

Guégan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S. Recruitment of the Mitochondrial-Dependent Apoptotic Pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurosci* 2001;21:6569–76.

Gunasekaran R, Narayani RS, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Shobha K, Nalini A, et al. Exposure to cerebrospinal fluid of sporadic amyotrophic lateral sclerosis

## *Bibliografía*

patients alters Nav1.6 and Kv1.6 channel expression in rat spinal motor neurons. *Brain Res* 2009;1255:170–9.

Guo H, Lai L, Butchbach MER, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, et al. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet* 2003;12:2519–32.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994;264:1772–5.

Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 1998;23:249–56.

Hashimoto K, Hayashi Y, Watabe K, Inuzuka T, Hozumi I. Metallothionein-III prevents neuronal death and prolongs life span in amyotrophic lateral sclerosis model mice. *Neuroscience* 2011;189:293–8.

He CZ, Hays AP. Expression of peripherin in ubiquitinated inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2004;217:47–54.

Henkel JS, Engelhardt JI, Siklós L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, et al. Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 2004;55:221–35.

## *Bibliografía*

Henkel JS, Beers DR, Siklós L, Appel SH. The chemokine MCP-1 and the dendritic and myeloid cells it attracts are increased in the mSOD1 mouse model of ALS. *Mol Cell Neurosci* 2006;31:427–37.

Hozumi I, Yamada M, Uchida Y, Ozawa K, Takahashi H, Inuzuka T. The expression of metallothioneins is diminished in the spinal cords of patients with sporadic ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 2008;9:294–8.

Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, et al. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 2011;303:95–9.

Huang C, Zhou H, Tong J, Chen H, Liu Y-J, Wang D, et al. FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *PLoS Genet* 2011;7:e1002011.

Ishigaki S, Niwa J ichi, Ando Y, Yoshihara T, Sawada K ichi, Doyu M, et al. Differentially expressed genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis spinal cords--screening by molecular indexing and subsequent cDNA microarray analysis. *FEBS Lett* 2002;531:354–8.

Joyce PI, Fratta P, Fisher EMC, Acevedo-Arozena A. SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mamm Genome* 2011;22:420–48.

Kanias GD, Kapaki E. Trace elements, age, and sex in amyotrophic lateral sclerosis disease. *Biol Trace Elem Res* 1997;56:187–201.

## *Bibliografia*

Kapaki E, Zournas C, Kaniias G, Zambelis T, Kakami A, Papageorgiou C. Essential trace element alterations in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1997;147:171–5.

Kato S. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008;115:97–114.

Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 1999;19:5800–10.

Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011;91:461–553.

Kulshreshtha D, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Sathyaprabha TN, Nalini A, Raju TR. Vascular endothelial growth factor attenuates neurodegenerative changes in the NSC-34 motor neuron cell line induced by cerebrospinal fluid of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurodegener Dis* 2011;8:322–30.

Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, Buller J, Swash M, Martin JE, et al. Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. Morphology, distribution, and specificity. *Brain* 1991;114:775–88.

Levine JB, Kong J, Nadler M, Xu Z. Astrocytes interact intimately with degenerating motor neurons in mouse amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Glia* 1999;28:215–24.

## *Bibliografía*

Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, et al. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 2000;288:335–9.

Mackenzie IRA, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 2007;61:427–34.

Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 2010;9:995–1007.

Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012;11:323-30.

Matias-Guiu J, Galán L, Garcia-Ramos R, Vela A, Guerrero A. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia* 2007;22:368–80.

Matias-Guiu J, García-Ramos R, Galán L, Barcia J. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia* 2008;23:518–29.

Matias-Guiu J, Galán L, García-Ramos R, Barcia JA, Guerrero A. Cerebrospinal fluid cytotoxicity in lateral amyotrophic sclerosis. *Neurologia* 2010;25:364–73.

## *Bibliografía*

Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, et al. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res* 2006;83:119–33.

McLean J, Liu H-N, Miletic D, Weng YC, Rogaeva E, Zinman L, et al. Distinct biochemical signatures characterize peripherin isoform expression in both traumatic neuronal injury and motor neuron disease. *J Neurochem* 2010;114:1177–92.

Migheli A, Cordera S, Bendotti C, Atzori C, Piva R, Schiffer D. S-100beta protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 1999;261:25–8.

Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K. Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2006;112:597–603.

Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K. Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2011;302:14–8.

Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F, Malavolta M. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol* 2005;75:367–90.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.

Mourelatos Z, Gonatas NK, Stieber A, Gurney ME, Dal Canto MC. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant

## *Bibliografía*

Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1996;93:5472–7.

Nagano S, Satoh M, Sumi H, Fujimura H, Tohyama C, Yanagihara T, et al. Reduction of metallothioneins promotes the disease expression of familial amyotrophic lateral sclerosis mice in a dose-dependent manner. *Eur J Neurosci* 2001;13:1363–70.

Nagano I, Murakami T, Manabe Y, Abe K. Early decrease of survival factors and DNA repair enzyme in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice that express a mutant SOD1 gene. *Life Sci* 2002;72:541–8.

Nagaraja TN, Gourie-Devi M, Nalini A, Raju TR. Neurofilament phosphorylation is enhanced in cultured chick spinal cord neurons exposed to cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol* 1994;88:349–52.

Neumann H. Control of glial immune function by neurons. *Glia* 2001;36:191–9.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130–3.

Okamoto K, Hirai S, Amari M, Watanabe M, Sakurai A. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis immunostained with rabbit anti-cystatin C serum. *Neurosci Lett* 1993;162:125–8.

Okamoto K, Mizuno Y, Fujita Y. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 2008;28:109–15.

## *Bibliografía*

Pardo AC, Wong V, Benson LM, Dykes M, Tanaka K, Rothstein JD, et al. Loss of the astrocyte glutamate transporter GLT1 modifies disease in SOD1(G93A) mice. *Exp Neurol* 2006;201:120–30.

Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH Jr, Cleveland DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000;97:13901–6.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Compact 6th ed. Amsterdam: Elsevier; 2007.

Phukan J, Pender NP, Hardiman O. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2007;6:994–1003.

Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J. Neurosci* 2001;21:3369–74.

Puttaparthi K, Gitomer WL, Krishnan U, Son M, Rajendran B, Elliott JL. Disease progression in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis is dependent on both neuronal and non-neuronal zinc binding proteins. *J Neurosci* 2002;22:8790–6.

Ramamohan PY, Gourie-Devi M, Nalini A, Shobha K, Ramamohan Y, Joshi P, et al. Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients causes fragmentation of the Golgi apparatus in the neonatal rat spinal cord. *Amyotroph Lateral Scler* 2007;8:79–82.

## *Bibliografía*

Rao MS, Devi MG, Nalini A, Shahani N, Raju TR. Neurofilament phosphorylation is increased in ventral horn neurons of neonatal rat spinal cord exposed to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration* 1995;4:397–401.

Reed MG, Howard CV. Surface-weighted star volume: concept and estimation. *J Microsc* 1998;190:350–6.

Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg* 1977;47:577–81.

Robertson J, Doroudchi MM, Nguyen MD, Durham HD, Strong MJ, Shaw G, et al. A neurotoxic peripherin splice variant in a mouse model of ALS. *J Cell Biol* 2003;160:939–49.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362:59–62

Rothermundt M, Peters M, Prehn JHM, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 2003;60:614–32.

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1995;38:73–84.

Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2009;65:S3–9.

## *Bibliografía*

Sargsyan SA, Blackburn DJ, Barber SC, Monk PN, Shaw PJ. Mutant SOD1 G93A microglia have an inflammatory phenotype and elevated production of MCP-1. *Neuroreport* 2009;20:1450–5.

Sankaranarayani R, Nalini A, Rao Laxmi T, Raju TR. Altered neuronal activities in the motor cortex with impaired motor performance in adult rats observed after infusion of cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Behav Brain Res* 2010;206:109–19.

Sathasivam S, Shaw PJ. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis--what is the evidence? *Lancet Neurol* 2005;4:500–9.

Schymick JC, Talbot K, Traynor BJ. Genetics of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics* 2007;16:R233–R242.

Sen I, Nalini A, Joshi NB, Joshi PG. Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients preferentially elevates intracellular calcium and toxicity in motor neurons via AMPA/kainate receptor. *J Neurol Sci* 2005;235:45–54.

Shahani N, Nalini A, Gourie-Devi M, Raju TR. Reactive astrogliosis in neonatal rat spinal cord after exposure to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 1998;149:295–8.

Shahani N, Gourie-Devi M, Nalini A, Raju TR. Cyclophosphamide attenuates the degenerative changes induced by CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis in the neonatal rat spinal cord. *J Neurol Sci* 2001;185:109–18.

Shahani N, Gourie-Devi M, Nalini A, Rammohan P, Shobha K, Harsha HN, et al. (-)-Deprenyl alleviates the degenerative changes induced in the neonatal rat

## *Bibliografia*

spinal cord by CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2004;5:172–9.

Shaw PJ. Toxicity of CSF in motor neurone disease: a potential route to neuroprotection. *Brain* 2002;125:693–4.

Shobha K, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Nalini A, Sathyaprabha TN, Raju TR. Altered in-vitro and in-vivo expression of glial glutamate transporter-1 following exposure to cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Sci* 2007;254:9–16.

Shobha K, Alladi PA, Nalini A, Sathyaprabha TN, Raju TR. Exposure to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients induces morphological transformation of astroglia and enhances GFAP and S100beta expression. *Neurosci Lett* 2010;473:56–61.

Siddique T, Ajroud-Driss S. Familial amyotrophic lateral sclerosis, a historical perspective. *Acta Myol* 2011;30:117–20.

Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1998;44:696–9.

Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008;319:1668–72.

## *Bibliografía*

Süssmuth SD, Sperfeld AD, Hinz A, Brettschneider J, Endruhn S, Ludolph AC, et al. CSF glial markers correlate with survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 2010;74:982–7.

Terro F, Lesort M, Viader F, Ludolph A, Hugon J. Antioxidant drugs block in vitro the neurotoxicity of CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 1996;7:1970–2.

Tikka TM, Vartiainen NE, Goldsteins G, Oja SS, Andersen PM, Marklund SL, et al. Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. *Brain* 2002;125:722–31.

Tokuda E, Ono S-I, Ishige K, Naganuma A, Ito Y, Suzuki T. Metallothionein proteins expression, copper and zinc concentrations, and lipid peroxidation level in a rodent model for amyotrophic lateral sclerosis. *Toxicology* 2007;229:33–41.

Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 2008;85:94–134.

Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, Van Houtte E, Robberecht W. Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci* 2000;180:29–34.

Van Den Bosch L. Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:348765.

Van Welsem ME, Hogenhuis JA, Meininger V, Metsaars WP, Hauw J-J, Seilhean D. The relationship between Bunina bodies, skein-like inclusions and

## *Bibliografía*

neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2002;103:583–9.

Vargas MR, Johnson JA. Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics* 2010;7:471–81.

Vela A, Galán L, Valencia C, Torre P de la, Cuadrado ML, Esteban J, et al. [SOD1-N196 mutation in a family with amyotrophic lateral sclerosis]. *Neurologia* 2012;27:11–5.

Vijayalakshmi K, Alladi PA, Sathyaprabha TN, Subramaniam JR, Nalini A, Raju TR. Cerebrospinal fluid from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients induces degeneration of a cultured motor neuron cell line. *Brain Res* 2009;1263:122–33.

Vijayalakshmi K, Alladi PA, Ghosh S, Prasanna VK, Sagar BC, Nalini A, et al. Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol. Dis* 2011;41:695–705.

Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiro Y, Nagano I, Abe K. Early decrease of survival signal-related proteins in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene. *Apoptosis* 2001;6:345–52.

Wegorzewska I, Baloh RH. TDP-43-based animal models of neurodegeneration: new insights into ALS pathology and pathophysiology. *Neurodegener Dis*. 2011;8:262–74.

## *Bibliografía*

Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:3.

Wilson ME, Boumaza I, Lacomis D, Bowser R. Cystatin C: a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 2010;5:e15133.

Yáñez M, Galán L, Matías-Guiu J, Vela A, Guerrero A, García AG. CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: protection by resveratrol but not riluzole. *Brain Res* 2011;1423:77–86.

Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, Bordessoule D, Couratier P, Wijdenes J, et al. In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2000; 109:211–20.

Zhou H, Huang C, Chen H, Wang D, Landel CP, Xia PY, et al. Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene. *PLoS Genet* 2010;6:e1000887.



## **X. ANEXOS**



## ANEXO I: El efecto citotóxico del LCR-ELA sobre cultivos de motoneuronas de rata causa apoptosis citoplasmática.

(Observación no publicada del grupo de Yañez y colaboradores)

Se obtuvieron neuronas de corteza motora de embriones de rata de 20 días de edad y se sembraron en placas a una densidad de 100.000 células/ml. Las neuronas se cultivaron durante 8-10 días y posteriormente se incubaron durante 24 horas con los LCR-ELA y LCR-control al 10 %. Además se hizo un cultivo control sin manipulación.

Se realizó un análisis inmunohistoquímico con anticuerpos frente a caspasa 3 y frente a TNF $\alpha$ , observándose un incremento de caspasa 3 y TNF $\alpha$  en las células incubadas con LCR-ELA, sin existir diferencias entre las que habían sido tratadas con LCR-control y el cultivo control sin tratar.

Grupo	Caspasa 3	TNF $\alpha$
Control	7,1 $\pm$ 3,4	2,2 $\pm$ 0,7
LCR control	10,3 $\pm$ 6,6	2,4 $\pm$ 0,1
LCR-ELA	27,8 $\pm$ 7,9*	4,9 $\pm$ 1,3*

**Tabla 18:** Expresión de caspasa 3 y TNF $\alpha$  en cultivos de motoneuronas, resultados expresados en porcentaje de células inmunorreactivas, como media  $\pm$  desviación estándar (\* diferencia estadísticamente significativa p<0,05).

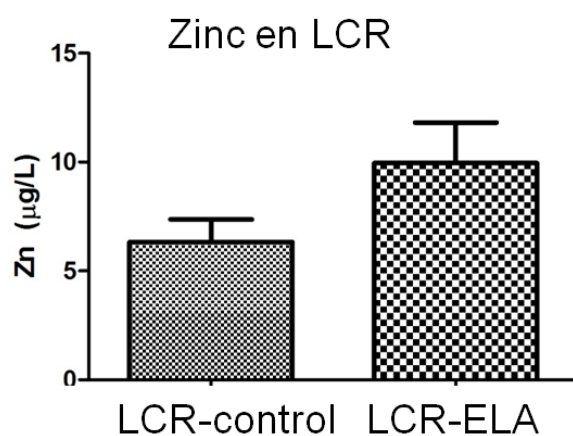
Ante estos resultados podemos concluir que el LCR de pacientes con ELA sobre cultivos de motoneuronas causa un aumento de caspasa 3 indicadora de activación de mecanismos de apoptosis. Además se asocia a un aumento del TNF $\alpha$  lo que podría indicar que la citotoxicidad está mayoritariamente mediada por la vía extrínseca de la apoptosis.

## ANEXO II: Determinación de zinc en LCR de pacientes con ELA y controles

De forma paralela a nuestro estudio, se llevó a cabo una determinación del zinc en LCR por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica, con corrección de fondo por efecto Zeeman, para ello se utilizó espectrómetro AAnalyst 800 de Perkin-Elmer, con una lámpara de zinc de cátodo hueco (Perkin-Elmer) con una intensidad de 15 mAmp. Se utilizaron estándares de zinc (Perkin Elmer N9300168) a concentraciones de 2,5 µg/L, 5µg/L y 10µg/L. Para comprobar la reproducibilidad y precisión de las medidas en cada serie de muestras se evaluaron controles de calidad de zinc para orina (Seronorm® Trace Elements Urine Blank).

Se analizaron 3 muestras de LCR procedentes de humanos sin ELA y 14 muestras de LCR-ELA.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de zinc en LCR procedente de pacientes con ELA y el LCR control (Figura 34).



**Figura 34:** Contenido de zinc en LCR procedente de pacientes con ELA y controles, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.



