



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Licenciatura en Investigación
Biomédica Básica**

Facultad de Medicina

**Participación de la NADPH oxidasa en el
mecanismo de excitotoxicidad por AMPA en
la médula espinal**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

Diana Lizbeth de la Cruz Ramírez

TUTOR: Dr. Ricardo Tapia Iburgüengoytia

México, D.F.

Octubre, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice	
I.RESUMEN.....	3
II.-LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
III.- INTRODUCCIÓN.....	5
Consideraciones anatómicas.....	5
<i>Columna vertebral.....</i>	<i>5</i>
<i>Médula espinal.....</i>	<i>5</i>
<i>Las motoneuronas.....</i>	<i>7</i>
<i>Distribución de las motoneuronas en la médula espinal.....</i>	<i>7</i>
<i>Citoarquitectura de la médula espinal.....</i>	<i>7</i>
<i>Nervios espinales.....</i>	<i>8</i>
<i>Relación de las columnas de MNs con su inervación muscular.....</i>	<i>10</i>
Esclerosis lateral amiotrófica.....	11
<i>Excitotoxicidad y esclerosis lateral amiotrófica.....</i>	<i>11</i>
NADPH oxidasas.....	12
<i>NADPH oxidasas y esclerosis lateral amiotrófica.....</i>	<i>13</i>
IV.- OBJETIVOS.....	15
V.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
Animales.....	16
Procedimiento quirúrgico.....	16
Preparación de las minibombas osmóticas y tratamiento.....	16
Evaluación de la función motora.....	16
Histología e inmunohistoquímica.....	17
Análisis estadístico.....	17
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
La infusión crónica de AMPA genera déficit motor y muerte neuronal.....	18

Distribución segmental de la muerte de motoneuronas por la infusión crónica de AMPA.....	20
<i>Los segmentos lumbares de la médula espinal tienen características morfológicas diferentes.....</i>	<i>20</i>
<i>Los grupos de motoneuronas son ChaT positivas.....</i>	<i>21</i>
<i>El AMPA difunde a los segmentos lumbares de la médula espinal.....</i>	<i>21</i>
<i>Vulnerabilidad de grupos de motoneuronas a AMPA.....</i>	<i>26</i>
<i>Análisis teórico de la parálisis por la actividad excitotóxica del AMPA y su relación con la pérdida de función muscular.....</i>	<i>30</i>
Efecto de la apocinina sobre la acción excitotóxica del AMPA.....	31
VII.- CONCLUSIONES.....	41
IX.- REFERENCIAS.....	42

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada fundamentalmente por una progresiva muerte de motoneuronas (MNs) espinales. Aunque el mecanismo preciso de muerte es desconocido, numerosos datos sugieren la participación de la excitotoxicidad mediada por glutamato y del estrés oxidativo producido por especies reactivas de oxígeno (Cleveland y Rothstein, 2001; Corona et al., 2007). Las NADPH oxidasas (NOXs) son una fuente importante del radical superóxido, por lo que se ha postulado que su actividad puede estar relacionada con la neurodegeneración (Brennan et al., 2009). Usando un modelo de excitotoxicidad *in vivo* diseñado en nuestro laboratorio que consiste en la perfusión crónica de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) directamente en la región lumbar de la médula espinal de rata, mediante una minibomba osmótica (Tovar-y-Romo et al., 2007), se evaluó si la inhibición de las NOXs por la apocinina (APO) tenía un efecto protector contra la neurodegeneración y la parálisis producida por el AMPA. La APO (10 mM) coperfundida con AMPA no modificó el efecto neurotóxico del AMPA, medido por pruebas de conducta motora (rotarod, Paw Grip Endurance task (PGE por sus siglas en inglés) y registro de huellas) y por análisis histológico de la médula espinal. Sin embargo, cuando se aumentó la concentración de APO a 30 y 60 mM se observó un retraso en el progreso de la parálisis de la extremidad contralateral al implante, medido en el PGE y en el registro de huellas, en comparación con el AMPA solo. En la prueba del rotarod no se encontraron diferencias significativas. El análisis histológico mostró que en los segmentos L2-L4 del lado contralateral el número de MNs sanas fue el doble en las ratas tratadas con APO, comparado con el lado implantado y con el grupo tratado con AMPA solo, lo cual correlaciona con la protección en la conducta motora. Cuando la APO se inyectó i.p. (25 mg/Kg) durante 4 días previos al implante y 2 días después, no se observó protección contra los efectos del AMPA, ni en las pruebas motoras (rotarod, PGE y registro de huellas) ni en el análisis histológico. El conjunto de estos resultados sugiere que las NOXs no participan de manera primordial en el proceso neurodegenerativo producido por la excitotoxicidad por AMPA. Concluimos que la protección motora parcial ejercida por la APO 30 y 60 mM podría deberse a una difusión más restringida del AMPA en el tejido en presencia de altas concentraciones de APO, más que a una protección por la inhibición de las NOXs.

En este trabajo también se determinó que segmentos lumbares de la médula espinal adyacentes al sitio del implante (segmento L4) se ven afectados por la infusión de AMPA en nuestro modelo y se realizó un análisis teórico, en donde se relaciona la muerte de MNs, el progreso de la parálisis de las extremidades traseras y la pérdida de función de algunos grupos musculares clave para el funcionamiento de la extremidad (este análisis se basó en Nicolopoulos-Stournaras e Iles, 1983; Watson et al., 2009). En el día 1 de tratamiento con AMPA la muerte de MNs del lado implantado se observa en los segmentos L2-L5, mientras que del lado contralateral al implante la muerte solo se observa en el segmento L4. Para el día 3 de tratamiento en el lado implantado se observa la muerte de MNs en todos los segmentos lumbares (L1-L6), mientras que del lado contralateral se observa muerte en los segmentos L1-L5. Basados en el análisis teórico, proponemos que la parálisis en nuestro modelo se correlaciona con la pérdida de función de los músculos flexores y extensores en la primera etapa, seguidos por los músculos del grupo de tríceps y con la pérdida en la última etapa del músculo glúteo y los grupos musculares aductores, psoas-ilíaco y cuádriceps. La conclusión para esta parte de nuestro trabajo es que el AMPA difunde a todos los segmentos lumbares de la médula espinal en el día 3 de tratamiento y que la muerte de las MNs que se va generando durante el proceso de difusión del AMPA, determina la pérdida secuencial de grupos de músculos que se correlaciona con la parálisis observada.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis

AMPA: α -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazolpropionato

APO: Apocinina

BF: Buffer de Fosfato

ChAT: Colina Acetiltransferasa

CV: Columna Vertebral

EE: Error Estándar

Fig.: Figura

GFAP: Proteína Ácida Glial Fibrilar

I.p.: Intraperitoneal

L1: Segmento Lumbar 1

L2: Segmento Lumbar 2

L3: Segmento Lumbar 3

L4: Segmento Lumbar 4

L5: Segmento Lumbar 5

L6: Segmento Lumbar 6

ME: Médula Espinal

MNs: Motoneuronas

NMDA: N-Metil-D-aspartato

NOXs: NADPH oxidasas

PGE: Paw Grip Endurance task

ROS: Reactive Oxygen Species

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD1: Superóxido Dismutasa

INTRODUCCIÓN

Consideraciones anatómicas

En esta sección se recopiló la información anatómica necesaria para nuestro proyecto. Debido a la escasez de información en la literatura de la anatomía de rata, el cual es nuestro modelo de estudio, para algunos temas se complementó la información con la anatomía de humano y perro, dos especies de las cuales se conoce muy bien su anatomía y que desde el punto de vista anatómico-funcional se pueden comparar con la rata.

Columna vertebral

La columna vertebral (CV) o columna espinal es una estructura que se encuentra como eje principal del esqueleto de todos los vertebrados, está constituida por piezas óseas superpuestas llamadas vértebras (Fig. 1). La CV se divide en cinco segmentos, de rostral a caudal, son: cervical, torácico, lumbar, sacro y cóccix (algunos autores consideran el sacro y cóccix como una porción llamada pelviana). En el humano se encuentran usualmente 7 vértebras cervicales, 12 torácicas, 5 lumbares, 5 sacras y 4 coccígeas, mientras que en la rata se encuentran 7 cervicales, 13 torácicas, 6 lumbares, 4 sacras y de 8 a 32 coccígeas (región de la cola). El segmento al que pertenece cada vértebra está determinado por los nervios espinales (definidos más adelante) como se muestra en la Fig. 2.

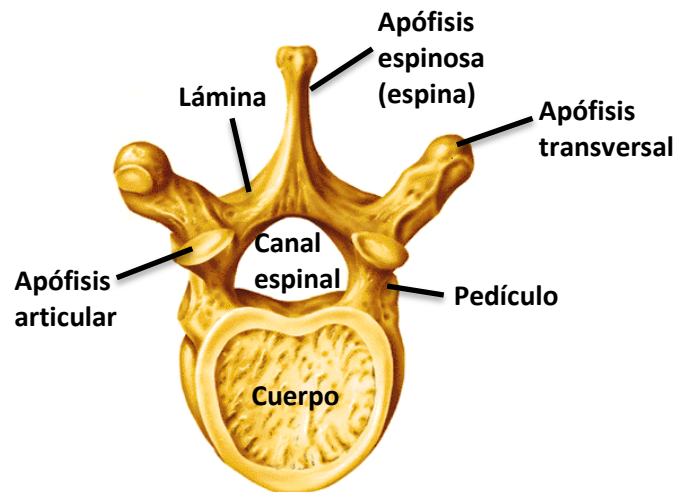


Fig. 1 Imagen de una vértebra tipo y sus caracteres comunes. Las vértebras están constituidas por un cuerpo y un macizo apofisario (4 apófisis articulares, 2 apófisis transversales, 2 láminas y una apófisis espinosa o espina) unidos por los pedículos. En conjunto estas estructuras protegen a la médula espinal que se encuentra en el canal espinal.

Médula espinal

La médula espinal (ME) pertenece al Sistema Nervioso Central (SNC), se encuentra alojada dentro del canal espinal de la CV. Este órgano tiene la forma de un cilindro y se encuentra aplanado ligeramente en el sentido dorso-ventral. La ME se encuentra protegida por tres membranas llamadas meninges, la membrana externa o duramadre, la membrana intermedia o aracnoides y la membrana interna o piamadre. La ME solo ocupa los primeros dos tercios del canal espinal, mientras que el último tercio son raíces espinales y meninges como se observa en la Fig. 2. La ME

presenta dos engrosamientos, el primero se encuentra en la zona cervical (C5-T1 en humano y rata) y el segundo en la zona lumbo-sacral (L2-S2 en humano y de L2-L6 en rata).

Al igual que la CV, la ME se divide en segmentos determinados por los nervios espinales, en el humano se observan 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacras y 1 coccígea (Fig. 2) y en la rata se observan 8 cervicales, 13 torácicos, 6 lumbares, 4 sacras y 3 coccígeas.

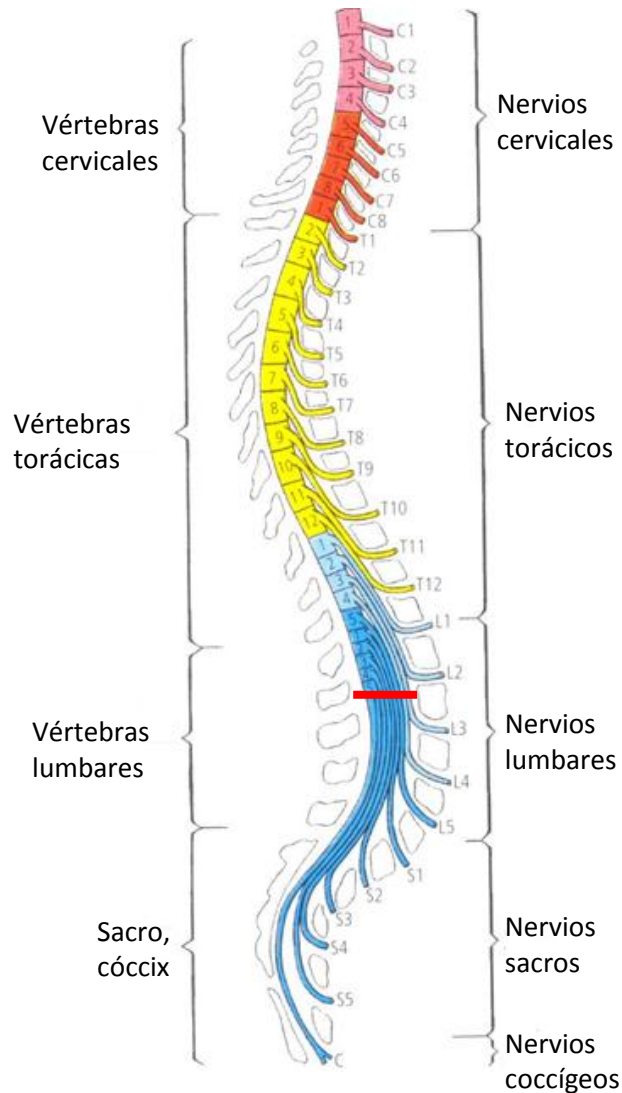


Fig. 2 Esquema que relaciona la médula espinal, la columna vertebral y los nervios espinales en humano. Nótese que la división de los segmentos cervicales, torácicos, lumbares, sacros y coccígeos en la médula espinal y la columna vertebral esta determinada por los nervios espinales. Debido a que la médula espinal sólo ocupa dos terceras partes del canal espinal (la línea roja señala el extremo de la médula espinal y a partir de aquí solo se encuentran meninges y nervios), los tipos y números de vértebras con sus correspondientes segmentos medulares se encuentran desfasados (Figura de Latarjet, Ruiz, 2004).

Las motoneuronas

Las motoneuronas (MNs) o neuronas motoras son células nerviosas que proyectan su axón hacia músculos y se encargan de generar y transmitir los impulsos nerviosos que provocan la contracción muscular. Estas células se localizan en el tallo cerebral, la corteza motora y principalmente en la ME. Existen dos grupos funcionales de MNs: las somáticas y las viscerales.

Las MNs somáticas inervan principalmente músculo esquelético, dentro de esta división se localizan las MNs α y las MNs γ . Las MNs α inervan a las fibras musculares extrafusales (o simplemente fibras musculares), participando en generar la contracción muscular voluntaria y mantener el tono muscular, mientras que las MNs γ inervan fibras musculares intrafusales e intervienen en la detección de la elongación del músculo. Debido a que las MNs α son las neuronas de interés en nuestro estudio, a partir de ahora a las MNs α se les llamará solo MNs.

Distribución de las motoneuronas en la médula espinal

Diferentes estudios han propuesto que las MNs se encuentran organizadas formando discretas columnas longitudinales a lo largo de la ME y que esta distribución está conservada entre especies (Watson et al., 2009).

Como se muestran en la Fig. 3, el arreglo columnar de las MNs (mostrado como bandas continuas) en los segmentos lumbares de rata se demuestra en Kaizawa y Takahashi (1970). Estos autores señalan que las columnas que ellos observan difieren ligeramente de animal a animal, pero que sin embargo la posición relativa entre éstas es consistente. Ellos también sugieren que el arreglo columnar de las MNs se vuelve más complejo a partir del segmento L4 y que comienza a desaparecer hacia el segmento L6. Subsecuentes estudios como el de Nicolopoulos-Stournaras e Iles (1983) realizaron cambios en la numeración y la distribución de las columnas de MNs, sin embargo la idea general de la distribución se ha conservado.

Este particular acomodo de las MNs en la ME es importante para visualizar a estas células en constante comunicación entre los segmentos y como se verá más adelante, esta manera de distribución neuronal también está relacionada con su inervación muscular.

Citoarquitectura de la médula espinal

La materia gris de la ME tiene una organización intrínseca en donde existen diferentes tipos celulares, estas células difieren en forma, en tamaño y en densidad. En 1954 por primera vez Rexed describió la citoarquitectura de la ME de gato, en donde a cada zona regular según el tipo celular la denominó lámina; con base a esto los subsecuentes estudios de la citoarquitectura de la médula en diferentes especies adoptan esta nomenclatura.

En la ME de rata se han descrito 10 láminas partiendo de la zona dorsal a la zona ventral. De la lámina I a la VI se denomina zona dorsal, aquí se encuentra una gran cantidad de interneuronas muy heterogéneas cuya función principal se ha relacionado con la sensibilidad. La lámina VII se considera la zona intermedia, se caracteriza por tener interneuronas que pueden influir directamente en las respuestas de las MNs; principalmente se ha descrito que lo hacen de manera inhibitoria usando como neurotransmisores al GABA y a la glicina. Las láminas VIII-IX pertenecen a la zona denominada ventral; en la lámina VIII se encuentran interneuronas con características similares a las descritas para la lámina VII, además de que aquí también se encuentran las MNs γ (función ya descrita). En la región de la lámina IX se encuentran los grupos de MNs que inervan a

músculo y son las responsables de la función motora. La lámina X es la zona que rodea al canal central.

Aunque la función de cada tipo celular de las diferentes láminas descritas en la ME no está completamente definida, los estudios hasta ahora sugieren que cada tipo celular tiene una función específica e importante para el funcionamiento integral de la ME.

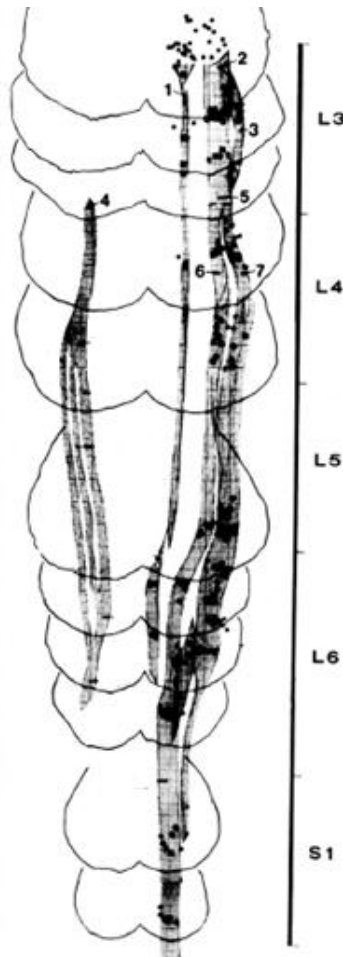


Fig. 3 Distribución columnar de las MNs en los segmentos lumbares de la ME en ratona. En esta imagen se observa una reconstrucción de las columnas de MNs (bandas continuas) en el asta ventral de la ME a lo largo de los segmentos lumbares realizada por Kaizawa y Takahashi (1970). Para esta reconstrucción se usaron ratas albinas sin ningún tratamiento y se observaron los grupos de MNs localizados en el asta ventral de la ME en los diferentes segmentos. Los números del 1-7 señalan las columnas de MNs y la línea negra señala los segmentos lumbares del 3 al 6 y al segmento sacro 1.

Nervios espinales

Los nervios espinales surgen de la ME y se forman a partir de la convergencia de las raíces dorsales y ventrales correspondientes de cada segmento, atraviesan los músculos vertebrales e inervan músculos esqueléticos.

Tabla 1. Relación de los nervios del plexo lumbosacro con su origen en la ME y su inervación a músculo en humano, perro y rata. Datos obtenidos de Sutachán et al., (2000); Watson et al., (2009); Latarjet et al., (2004); López et al., (2004); Nicolopoulos- Stournaras et al., (1983). Los cuadros en blanco indican ausencia de información. Para más detalles en rata, ver Tabla 2.

Nervios del plexo lumbo-sacro	Función	Principales músculos o grupos de músculos que inervan			Segmentos en la ME de donde se originan		
		Humano (H)	Perro (P)	Rata (R)	H	P	R
Nervio cutáneo femoral lateral	sensitivo				L2 L3	L3 L4	
Nervio femoral	El nervio femoral motor asegura la extensión de la rodilla, constituyendo la vía centrífuga del reflejo rotuliano.	<ul style="list-style-type: none"> • Psoas-iliaco • Pectíneo • Sartorio • Cuádriceps 	<ul style="list-style-type: none"> • sartorio • cuádriceps 	<ul style="list-style-type: none"> • Psoas-iliaco 	L2 L3 L4	L4 L5 L6	L1 L2 L3
Nervio obturador	Asegura la motricidad de los aductores	<ul style="list-style-type: none"> • Obturador externo • Pectíneo • Aductor largo • Aductor mayor • Grácil 	<ul style="list-style-type: none"> • Psoas-iliaco • Obturador Externo • Aductor Largo • Aductor Corto • Aductor Mayor • Grácil 		L2 L3 L4	L5 L6	
Nervio genito-femoral	Sensitivo	<ul style="list-style-type: none"> • cremáster 	<ul style="list-style-type: none"> • cremáster 		L1 L2	L3 L4	L2 L1
Nervio ciático	Flexión de la pierna sobre el muslo Flexión plantar de pie y dedos Flexión dorsal del pie y dedos	<ul style="list-style-type: none"> • Semitendinoso • Semimembranoso • Bíceps femoral • Aductor mayor • Poplíteo • Gastrocnemio • Plantar • Sóleo • Tibial • Flexor de dedos • Peroneo • Extensor de dedos 	<ul style="list-style-type: none"> • Semitendinoso • Semimembranoso • Bíceps femoral • Aductor mayor • Poplíteo • Gastrocnemio • Plantar • Sóleo • Tibial • Flexor de dedos • Peroneo • Extensor de dedos • obturador interno 	<ul style="list-style-type: none"> • Semitendinoso • Semimembranoso • Bíceps femoral • Aductores • Tibial • Peroneo • Flexores de dedos • Extensores de dedos 	S1 S2 S3	L6 L7 S1 S2	L1 L2 L4 L5 L6

De manera general se considera que los nervios que salen de la región cervical de la ME inervan músculos de cabeza, cuello, brazos y manos (extremidad delantera en rata), los de la región torácica inervan músculos de pecho y abdominales y los de la región lumbar inervan músculos de piernas y pies (extremidad trasera en rata), sin embargo, esto no es tan sencillo, antes de su distribución periférica los nervios de los distintos segmentos se comunican y unen entre sí, formando lo que se conoce como plexos braquial y lumbosacro. Para términos de este estudio a partir de aquí solo se va a describir el plexo lumbosacro debido a que nuestro trabajo de investigación está orientado a la extremidad trasera.

El plexo lumbosacro en rata se forma de 6 nervios lumbares y 4 nervios sacros, esta compuesto por nervios sensitivos, motores y mixtos, dando como resultado inervación sensitiva, motora,

vasomotora (movimientos de contracción y dilatación de los vasos sanguíneos) y propioceptiva (posición de los músculos) a la región del tronco y a las extremidades traseras.

Como se observa en la Tabla 1, del plexo lumbosacro derivan 5 nervios según la división anatómica de humano: el nervio cutáneo femoral lateral, nervio femoral, nervio obturador y el nervio genito-femoral que corresponden al plexo lumbar y el nervio ciático que corresponde al plexo sacro. Para el caso del perro y la rata el nervio ciático, a diferencia del humano, también esta compuesto por nervios lumbares.

Relación de las columnas de motoneuronas con su inervación muscular

Estudios realizados a mediados del siglo XX por medio del transporte retrógrado de la peroxidasa de rábano picante y la sección de nervios, lograron relacionar las columnas de MNs observadas en la ME y su inervación específica a cada músculo. Debido a la complejidad de los experimentos diseñados para determinar esta relación, en la literatura existe controversia sobre la inervación de algunos músculos; no obstante, en Watson et al., (2009), se sugiere que estos trabajos tienen un grado útil de aproximación y que este nivel puede ser suficiente para realizar estudios funcionales y patológicos de la ME.

Recopilando información de los libros y artículos citados en las referencias de la Tabla 1, se resumieron los datos de humano, perro y rata, que relacionan el nervio, su función fisiológica, los músculos que inerva y los segmentos de la ME de donde se propone que surge. Nótese que los segmentos lumbares de donde surgen los nervios del plexo lumbosacro difieren entre las tres especies; sin embargo cada nervio parece inervar los mismos músculos y tener la misma función.

Los estudios de la anatomía de nervios de rata son deficientes comparados con humano y perro y por eso en la Tabla 1 se observan huecos de información para esta especie, para el establecimiento de la relación de los segmentos de la ME y la inervación a músculos en rata, se usaron los datos de Nicolopoulos-Stournaras e Iles, (1983) y Watson et al., (2009), como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Relación de la inervación muscular con su origen en la ME de rata. Datos obtenidos de Nicolopoulos- Stournaras et al., (1983); Watson et al., (2009).

Grupos de músculos o músculos	Segmentos de la ME de donde se propone que son inervados	Columna según Kaizawa y Takahashi (1970) (ver Fig. 3)
Psoas-ilíaco	L1-L3	Columna 1
Cuádriceps	L2-L3	Columna 3
Aductores	L1-L3	Columna 2
Crémaster	L2-L1	Columna 2
Glúteo	L3-L5	Columna 3
Tríceps sural	L4-L6	Columna 7
Flexores	L3-L5	Columna 6
Extensores	L4-L5	Columna 6

Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS por sus siglas en inglés) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una progresiva muerte de MNs en la zona ventral de la ME, el tallo cerebral y la corteza motora. Existen dos tipos de ALS, la esporádica y la familiar, donde el 90% de los casos corresponde al tipo esporádico y solo el 10% para el tipo familiar. Las manifestaciones clínicas de ambos tipos de ALS son prácticamente idénticas. De manera general se ha descrito que los pacientes presentan debilidad asimétrica de las extremidades inferiores, calambres (en las primeras horas de la mañana), pérdida de peso, atrofia muscular, fasciculaciones y parálisis progresiva que generalmente se desarrolla de caudal a rostral. Para el caso de la ALS familiar se ha implicado un factor genético, en donde el ~20% corresponde a mutaciones en la superóxido dismutasa (SOD1) y el otro 80% corresponde a mutaciones en la alsina, la senataxina, la proteína B asociada a VAMP, la dinactina entre otras (Pasinelli y Brown, 2006).

El mecanismo preciso de la muerte neuronal en ALS es desconocido, sin embargo se han propuesto diferentes mecanismos entre los que están implicados disfunción mitocondrial, daño oxidativo, defectos en transporte axonal, inflamación, alteraciones en glía y excitotoxicidad por glutamato (Cleveland y Rothstein, 2001). A pesar de los múltiples estudios llevados a cabo para determinar si un mecanismo es determinante para desencadenar la muerte neuronal, hasta ahora no hay datos concluyentes, incluso se ha propuesto que mas de un factor puede estar determinando la muerte de las MNs.

Excitotoxicidad y esclerosis lateral amiotrófica

El glutamato es el neurotransmisor excitador más importante del SNC, participa fisiológicamente en procesos tan importantes como la memoria y el aprendizaje. Hasta ahora se han descrito dos tipos de receptores a glutamato, los metabotrópicos y los ionotrópicos, de estos últimos tenemos los NMDA, AMPA y kainato. Los receptores ionotrópicos son canales que al unir su ligando se vuelven permeables a iones, entre ellos el calcio, por lo tanto, se ha propuesto que una sobreactivación de sus receptores, provoca una entrada masiva de calcio que puede generar un proceso neurodegenerativo (Corona et al., 2007).

Como ya se ha mencionado, la excitotoxicidad por glutamato se ha propuesto como un mecanismo que promueve la muerte de las MNs en ALS, principalmente en el tipo esporádico. Esta hipótesis se basa principalmente en tres observaciones experimentales, la primera es la disminución del transportador de glutamato GLT1 (se encuentra principalmente en astrocitos y que se encarga de la recaptura de glutamato una vez que ha activado a su receptor) en pacientes post mortem con ALS esporádico (Rothstein et al., 1992), la segunda es el aumento de la concentración de glutamato en líquido cefalorraquídeo (basados en su valor control de glutamato $0.341 \pm 0.166 \mu\text{M/l}$) que se encontró en el 40.8% de pacientes en un estudio pos mortem con ALS esporádico (Spreux-Varoquaux et al., 2001) y la tercer observación es que la sobreactivación de los receptores tipo AMPA en ME causa la muerte de MNs y por consecuencia parálisis (Corona y Tapia, 2004). El conjunto de estos resultados sugiere que la excitotoxicidad por glutamato podría ser un evento principal que desencadena la muerte de MNs en ALS. Se propone que los receptores tipo AMPA son los responsables de la muerte debido a que agonistas de NMDA y kainato en ME no producen muerte (Corona y Tapia, 2004). La permeabilidad a calcio de los receptores AMPA esta determinada por la subunidad GluR2, subunidad que tiene un sitio de edición post-

transcripcional llamado “sitio Q/R” (glutamina/arginina). Cuando GluR2 esta ausente en los receptores o el sitio de edición no se encuentra editado, es decir, que tiene glutamina, los receptores AMPA son permeables a calcio; cuando el sitio de edición se encuentra editado (arginina) los receptores son impermeables a calcio. En ME se ha sugerido que los receptores AMPA tienen la subunidad GluR2 no editada (Corona et al., 2007). En Tovar-y Romo et al., (2009) se ha propuesto a la excitotoxicidad por AMPA en ME como un modelo para el estudio de la ALS.

NADPH oxidasas

El calcio es considerado un segundo mensajero de múltiples respuestas biológicas vitales para la célula. Sin embargo, una entrada masiva de calcio iónico como ocurre por una sobreactivación de receptores a glutamato permeables a calcio, activan una serie de procesos patológicos entre los que se encuentra la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés).

Las ROS son pequeñas moléculas químicas que son altamente reactivas debido a su inestabilidad química. Entre las moléculas mas comunes tenemos al superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). La acumulación en la célula de estas moléculas es tóxica debido a que pueden oxidar proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, alterando su función.

Durante un proceso de daño celular, la mitocondria se considera como el principal generador de ROS. Sin embargo, recientes estudios sugieren que además de la mitocondria, las enzimas NADPH oxidasas (NOXs) parecen ser una fuente importante del radical superóxido (Brennan et al., 2009; Lambeth, 2004). Las NOXs son una familia de enzimas que tienen como función principal la producción del radical superóxido, fueron descritas primeramente en células fagocíticas, sin embargo en la actualidad ya se han descrito en diferentes tipos celulares. La estructura y la activación de las NOXs varían entre los miembros de la familia. La enzima mejor caracterizada es la NOX2 o NOX prototipo, que se ha descrito principalmente en células fagocíticas y estructuralmente consta de varias subunidades localizadas en la membrana ($gp91^{phox}$ y $p22^{phox}$) y en el citosol ($p67^{phox}$, $p47^{phox}$ y $p40^{phox}$).

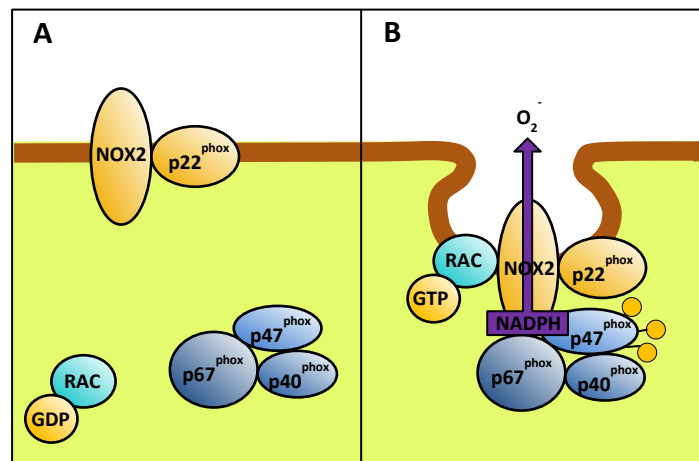


Fig. 4 Ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa 2. A) En reposo (inactiva) las subunidades NOX 2 ($gp91^{phox}$) y $p22^{phox}$ se encuentran en la membrana, mientras que las subunidades $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ y $p40^{phox}$ se encuentran en el citoplasma. B) Para la activación de la enzima se requiere de la interacción de las subunidades membranales y citosólicas, además de la unión de la proteína G Rac y del NADPH como sustrato. Este mecanismo de activación también ha sido sugerido para las NADPH oxidasas 1 y 4 (Adaptada de Bedard y Krause, 2007).

Para la activación de esta enzima se requiere de la interacción de las subunidades membranales y citosólicas, además de un reclutamiento de la proteína G Rac, y como sustrato al NADPH (Fig. 4). Esta forma de activación es conservada para las NOX1, 2 y 4, mientras que la NOX5 parece ser activada por calcio iónico (Sorace et al., 2012; Bedard, Krause, 2007).

Debido a que el estrés oxidativo se ha implicado en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y ALS, el estudio de las NOX en el SNC ha resultado muy interesante. La NOX2 se expresa principalmente en células gliales como microglía, sin embargo también se ha detectado su expresión en neuronas. Aparte de la expresión de NOX2, en el SNC también se ha identificado la NOX1, NOX4 y NOX5. A pesar de que varios estudios han propuesto la participación de estas enzimas en procesos de neurodegeneración, aun no está claro su papel en el proceso de la muerte neuronal (Sorace et al., 2012).

NADPH oxidasas y esclerosis lateral amiotrófica

Diversos estudios utilizando el modelo familiar de la ALS con la mutación SOD1^{G93A}, han reportado datos interesantes en donde se ha propuesto que la producción de superóxido de las NOXs podría ser un evento que determina la muerte de las MNs (Valdmanis et al., 2007).

Marden et al., (2007) describe que los ratones con la mutación SOD1^{G93A} knockouts para NOX1 y NOX2 tienen un retraso en el inicio de la parálisis, además de un aumento en la supervivencia de 33 y 97 días, respectivamente, comparado con sus controles. De manera semejante, la delección de la subunidad gp91^{phox} (subunidad de las NOXs) extiende la supervivencia de los ratones 13 días (Wu et al., 2006). La inhibición farmacológica de las NOXs por medio de apocinina (APO) (300 mg/kg) en el mismo modelo con la mutación SOD1^{G93A}, administrada en un estadio asintomático (a los 14 días de edad) en el agua de beber, también extiende la supervivencia de estos ratones hasta 113 días en comparación con sus controles (Harratz et al., 2008).

En estudios post mortem de la ME de pacientes con ALS esporádica, se encontró por medio de inmunohistoquímicas una sobreexpresión de la subunidad gp91^{phox} de las NOXs que colocaliza con un marcador para microglía (Wu et al., 2006). Este resultado apoya los hallazgos encontrados en el modelo familiar de la ALS donde se propone la participación de las NOXs en el proceso de neurodegeneración, pero además sugiere que la producción de superóxido es por células no neuronales como la microglía. Apoyando esta hipótesis, Harratz et al., (2008) demostraron que en cultivos de una línea celular neuronal y una línea celular de glía con la mutación SOD1^{G93A} (esta mutación de manera basal promueve la producción de ROS), la producción de superóxido con el tratamiento de APO solo disminuyó en la línea celular de glía, mientras que en la línea neuronal no se observó ningún cambio. Esto sugiere que el retraso en el progreso de la parálisis encontrada por el tratamiento de APO en el modelo familiar de ALS, se debe a la inhibición de las NOXs de células no neuronales.

Estos resultados en conjunto sugieren que la producción de superóxido por las NOXs participa de manera primordial en el proceso neurodegenerativo de la ALS y que esta producción de superóxido se debe a la activación de células gliales como microglía (Boilée y Cleveland, 2008). Sin embargo, en otro estudio (Trumbull et al., 2012), se inhibió a las NOXs con APO y diAPO (dímero de APO, descrito como un mejor inhibidor de las NOXs), administrándola en el agua de beber de los ratones con la mutación SOD1^{G93A}. Usando una concentración de 150 mg/kg/día de diAPO a partir de los 100 días de edad (inicio de la enfermedad), los animales mostraron un aumento en la supervivencia de 8 días, no así cuando el tratamiento con diAPO comenzó a los 21 días de edad. En los

experimentos de APO se usaron tres concentraciones 150, 300 y 750 mg/kg/día administrándola al día 21 de edad o al día 100; en ninguna de las combinaciones usadas se encontró diferencia significativa en la sobrevida con respecto al control.

La contradicción de estos resultados sugiere que se requieren de más estudios para poder tener conclusiones precisas acerca de la participación de las NOXs en el proceso de muerte de las MNs en la ALS.

OBJETIVOS

Con los antecedentes mencionados, uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar si el tratamiento con APO tenía un efecto protector contra la neurodegeneración y la parálisis producida por AMPA *in vivo*.

Para este trabajo se utilizó un modelo experimental desarrollado en nuestro laboratorio, descrito en Tovar-y-Romo et al., (2007), el cual consiste en la perfusión crónica de AMPA directamente en la región lumbar de la ME de rata, mediante una minibomba osmótica.

Otros objetivos de este trabajo fueron delimitar la zona de daño a lo largo de los segmentos lumbares de la ME producida en nuestro modelo y un análisis teórico para relacionar la muerte de las MNs, el progreso de la parálisis y la pérdida de función muscular en el transcurso de los días de tratamiento con AMPA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se usaron ratas macho Wistar de 280-310 g, durante el proceso de experimentación los animales estuvieron bajo ciclos controlados de luz-obscuridad, comida y agua *ad libitum*.

Procedimiento quirúrgico

El procedimiento experimental que se realizó está descrito por Tovar-y-Romo et al., (2007). Las ratas se anestesian con una mezcla de isoflurano-carbógeno y se colocan en un estereotáxico espinal. Una vez montadas, se hace una incisión longitudinal en la piel sobre la región lumbar de la CV, en donde por medio de estimulación intervertebral y la contracción seguida de la extremidad, se elige la vértebra que corresponde al segmento L4 de la ME. En la vértebra elegida se retiran los músculos que se encuentran sobre en el macizo apofisario y la espina es removida, de manera que la lámina quede totalmente expuesta (para un mayor entendimiento, ver Fig. 1). En la lámina izquierda (lado contralateral (contra)) se coloca un tornillo que ayudará más adelante a fijar el implante, mientras que en la lámina derecha (lado ipsilateral (ipsi)) se realiza una laminectomía parcial (~1 mm de diámetro) hasta observar la ME. Se le retiran las meninges y se inserta una cánula a ~1 mm de profundidad. Se vierte cemento acrílico sobre el tornillo y sobre el soporte plástico de la cánula, de tal manera que la manguera de la cánula quede expuesta para ser conectada más adelante al tubo de la minibomba osmótica. La minibomba osmótica se implanta subcutáneamente sobre la parte dorsal de la rata, a un costado de la vértebra utilizada y se une la manguera de la cánula con el tubo dosificador de la minibomba previamente preparada y estabilizada como se indica adelante. Cuando se termina de colocar el implante la piel de la rata se sutura y se le administra 1 mL de penicilina. Las ratas se mantienen por 3 días posteriores a la cirugía en el vivario y cada 24 h se les evalúa con pruebas motoras.

Preparación de las minibombas osmóticas y tratamiento

La administración de las drogas fue por medio de minibombas osmóticas Alzet, las cuales liberan 0.25 $\mu\text{l/h}$ por 28 días. Las minibombas osmóticas funcionan a partir de una diferencia de presión entre un compartimento dentro de la bomba (osmolaridad alta) y la del tejido donde se implanta.

Las minibombas osmóticas se llenaron con buffer de fosfato (BF) 0.1 M (control) y con AMPA 7.5 mM (Tocris) disuelto en BF 0.1 M. En los experimentos donde se coaplicó AMPA/APO (Aldrich chemistry) las bombas se llenaron con AMPA 7.5 mM disuelto en BF y con APO disuelto en 10% DMSO/BF (se usaron 3 concentraciones de APO, 10, 30 y 60 mM). Las minibombas se llenaron 48 h antes del implante y se mantuvieron en solución salina a 37°C para estabilizar su flujo.

Para los experimentos donde la APO se inyectó i.p. durante seis días, 4 días previos al implante y dos días después, la droga se disolvió en 10% DMSO/BF y la dosis fue de 25 mg/kg/día.

Evaluación de la función motora

Se usaron tres ensayos de evaluación motora, el rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA), el PGE (Paw Grip Endurance task) (Weydt et al., 2003) y el registro de huellas. Las ratas fueron habituadas una semana antes de la cirugía anteriormente descrita para las tres pruebas.

La prueba del rotarod consiste en un rodillo que acelera constantemente 0.2 rpm/s. Las ratas se colocaban individualmente sobre el rodillo y se entrenaban para que pudieran permanecer 120 s

como tiempo límite; se evaluaban en 3 intentos independientes y se elegía el intento en donde la rata permaneciera más tiempo sobre el rodillo.

La prueba del PGE consiste en que la rata escale una rejilla en posición vertical. Para esta prueba se coloca una rejilla horizontalmente a la altura de una mesa y en esta posición se coloca a la rata, inmediatamente a esto se gira la rejilla colocándola verticalmente y se contabiliza el tiempo que la rata tarda en subir o en caer. Para las gráficas de esta prueba los valores arriba del cero es el tiempo en subir y los valores por debajo del cero es tiempo en caer.

El registro de huellas es una prueba cualitativa en donde se aprecia la zancada de la rata. Para esta prueba se pintan las extremidades traseras de la rata y se le hace caminar sobre un papel para que registre su zancada.

Histología e inmunohistoquímica

Para el análisis histológico e inmunohistoquímico se anestesió a la rata con pentobarbital i.p. (1 mL), posteriormente se perfundió a la rata transcardialmente con 250 mL de solución salina fría 0.9%, seguido de una solución de paraformaldehído 4%. La ME fue extraída y se mantuvo en tratamiento de fijación en una solución de paraformaldehído 4% por una semana. Después de este tratamiento las médulas se sometieron a un proceso de deshidratación con gradientes de sacarosa (10%, 20%, 30%) por dos días cada solución, una vez cumplido este tratamiento se hicieron cortes transversales de 40 μm en un criostato. Para los análisis histoquímicos se utilizó la tinción de violeta de cresilo (técnica de flotación).

El conteo de MNs se realizó de dos maneras, la primera de ellas fue tomando en cuenta solo las MNs de cortes localizados en el sitio del implante (L5-L4) y la segunda manera fue promediando el número de MNs en 10 cortes secuenciales de 40 μm partiendo del segmento L6 (el cual era el primero en identificarse debido a sus características morfológicas conservadas entre ratas) hasta el segmento L2. Debido a que en el grupo control no se podía diferenciar el lado ipsi y el contra en los segmentos adyacentes al sitio del implante, el número de MNs de ambos lados se promediaron. El criterio para considerar a una MNs sana consistió en identificar células con un tamaño mayor a 25 μm y tener un núcleo distinguible, teniendo como comparación la histología de ratas intactas.

Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron anticuerpos para la colina acetiltransferasa (ChAT) (Sigma) y para la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) (Millipore), marcadores de MNs (debido a que las MNs son colinérgicas) y astroglia respectivamente, el método utilizado fue por flotación. Para la observación de las inmunohistoquímicas se utilizó un microscopio confocal Olympus IX81.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5 Demo, se analizó mediante ANOVA de una vía (análisis de varianza) $p=0.001$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La infusión crónica de AMPA genera déficit motor y muerte neuronal

La sobreactivación crónica de los receptores tipo AMPA en ME causa déficit motor progresivo correlacionado con la muerte de MNs, como se describió en Tovar-y-Romo et al., (2007). Estos resultados se reprodujeron, como se muestra en las Figs. 5 y 6. La infusión crónica de AMPA genera déficit en la conducta motora evaluada en rotarod, PGE y el registro de huellas, mientras que en las ratas control no se observó ninguna alteración (Fig. 5). Las ratas tratadas con AMPA en el día 1 de tratamiento muestran parálisis en la extremidad del lado donde se colocó el implante, ipsilateral a la infusión (ipsi), esto reflejado en la prueba del rotarod donde las ratas solo pueden permanecer 39 ± 5 s (Fig. 5C) comparado con las ratas control que permanecen 120 s y la prueba del PGE donde las ratas tardan mas tiempo en subir la rejilla (Fig. 5D). En el día 3 de tratamiento las ratas muestran parálisis bilateral, como se observa en el registro de huellas donde las ratas arrastran ambas extremidades y se ha perdido el registro de la zancada (Fig. 5B), comparada con el control (Fig. 5A). En el día 3 de tratamiento con AMPA las ratas caen a los 3 s del rotarod y en la prueba del PGE ya no escalan y caen a los 12 s (Fig. 5C y D).

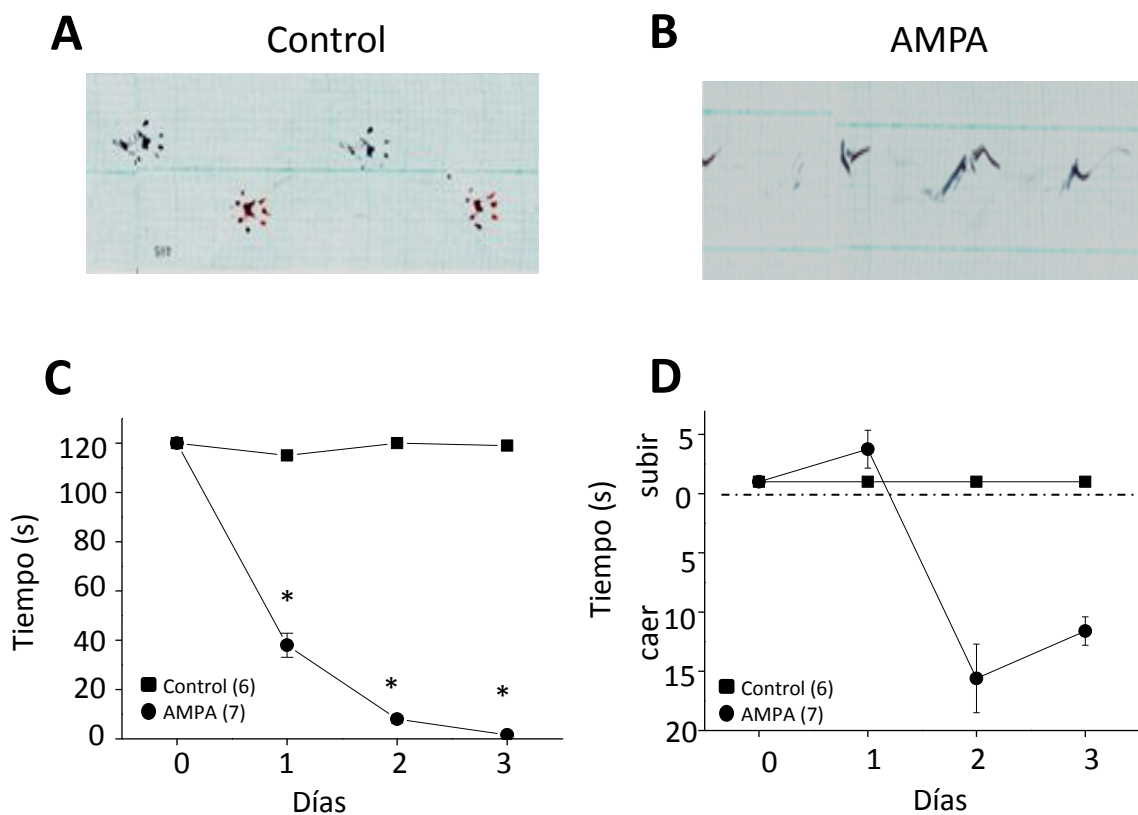
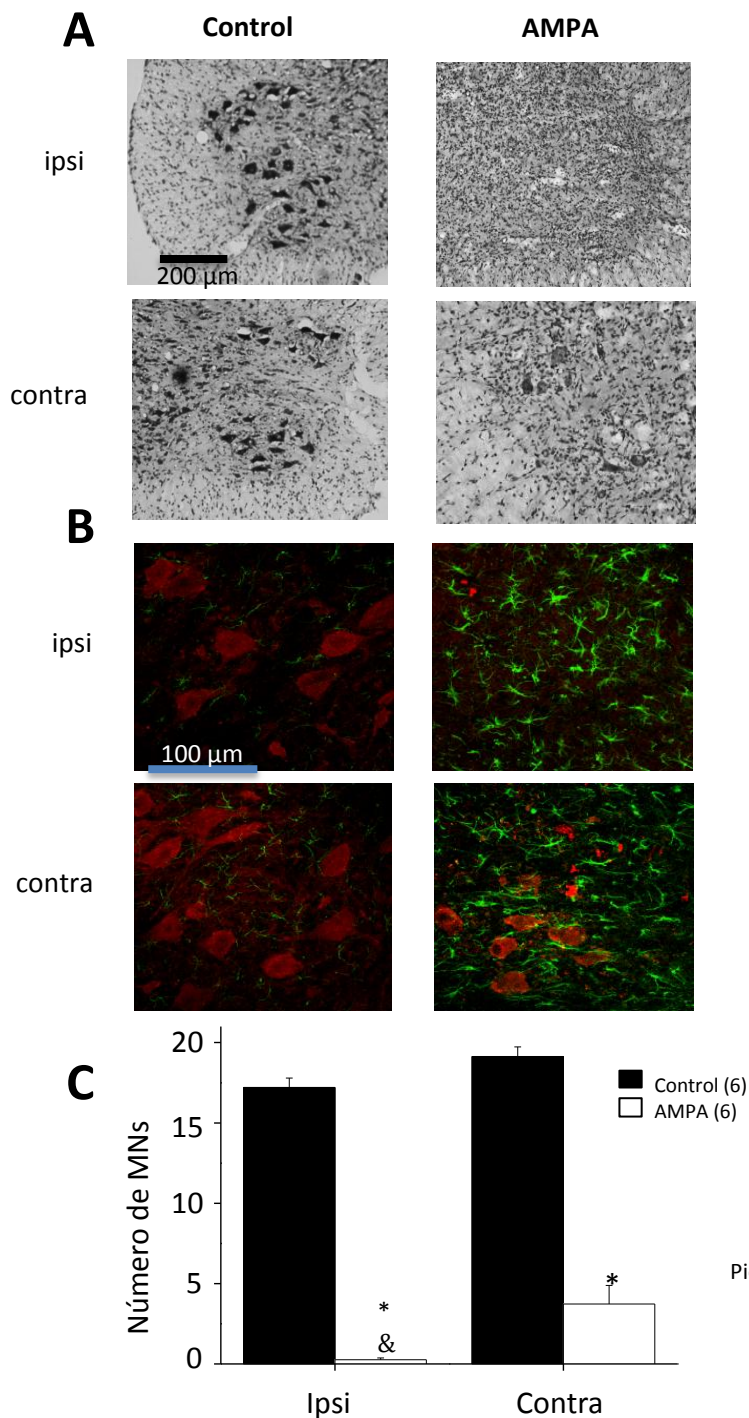


Fig. 5 La sobreactivación crónica de los receptores AMPA en la ME genera déficit motor progresivo. En A y B se observa un registro de huellas representativo en el día 3 de tratamiento, A) rata control y B) rata tratada con AMPA (7.5 mM). C) prueba de rotarod y D) prueba de PGE. Cada punto de la gráfica representa el promedio \pm EE del número de ratas mostrado en paréntesis. *, señala diferencia significativa contra el control ($p=0.001$).

En el análisis histológico realizado en el sitio del implante (L4-L5) se observa que en el día 3 de tratamiento en el lado ipsi ya no hay MNs, mientras que en el lado contra se observan 3.7 ± 1 MNs; en las ratas control se observan ~ 18 MNs tanto en el lado ipsi como en el contra (Fig. 6A y C). Esta pérdida neuronal se correlaciona con el déficit motor observado en las pruebas conductuales. Cabe destacar que además de la pérdida neuronal, mediante la marca con GFAP se observa un proceso de astrogliosis (Fig. 6B), similar a lo que ocurre en el modelo familiar de la ALS (Matsumoto et al., 2012).

Nuestro laboratorio ha sugerido a la infusión de AMPA en ME como un modelo experimental para el estudio de la ALS, debido a la importancia de generar nuevos modelos que no dependan de la variable genética que solo se presenta en el 10 % de todos los casos (Tovar-y Romo et al., 2009).



Pie de figura en la siguiente hoja

Fig. 6 La sobreactivación crónica de los receptores AMPA produce muerte de MNs en la ME. En A y B se observan micrografías representativas del asta ventral de la ME en el lado ipsilateral (ipsi) y contralateral (contra) al sitio del implante (segmentos L4-L5) en el día 3 de tratamiento. A) Tinción de violeta de cresilo y B) Inmunohistoquímicas para marcar MNs con ChAT (Colina Acetiltransferasa) en rojo y astrocitos con GFAP (Proteína Ácida Glial Fibrilar) en verde. C) Promedio \pm EE del número de MNs observadas en el sitio del implante en el día 3 de tratamiento (el número de ratas utilizado se muestra en paréntesis). *, señala diferencia significativa contra el control, &, diferencia significativa contra el control y el lado contra ($p=0.001$).

Distribución segmental de la muerte de motoneuronas por la infusión crónica de AMPA

A pesar de que durante la cirugía la cánula se coloca en el segmento L4 de la ME, se desconoce qué segmentos adyacentes a L4 pueden dañarse con la infusión crónica de AMPA debido a la difusión. Con base a esto, uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la región de daño en nuestro modelo.

Los segmentos lumbares de la médula espinal tienen características morfológicas diferentes

Para lograr uno de los objetivos de nuestro trabajo, se buscaron parámetros que nos permitieran identificar cada segmento y así poder determinar la zona de daño. En una primera aproximación, los segmentos de la ME se determinaron a partir de las raíces dorsales o ventrales de cada segmento, como se muestra en la Fig. 7 (Kaizawa y Takahashi, 1970). Midiendo la distancia entre cada raíz se estimó un promedio del largo (grosor) de cada segmento, el cual fue de ~ 1.6 - 1.8 mm; esta medida fue constante entre los segmentos L6-L1. Debido a limitaciones metodológicas al momento procesar la ME (cada ME solo podía utilizarse para analizar un segmento), esta manera de determinar cada segmento no resultó óptima, por lo que basados en el atlas de ME de rata de Watson et al., (2009) y en el de Paxinos et al., (1985), se definieron cuatro características morfológicas que nos ayudaron a diferenciar cada segmento, como se muestra en la Fig. 8. La primer característica tomada en cuenta fue la de la distribución y el número de los grupos de MNs que se encuentran en cada segmento. Este parámetro fue el de mayor importancia, debido a que es el mejor conservado entre ratas. Otro parámetro utilizado fue la distancia que existe entre el canal central y la materia blanca, distancia que disminuye en el sentido caudo-rostral. La tercer característica es la pendiente de la zona ventral de la materia gris, este parámetro es muy notorio para distinguir el segmento L6 de L5. El cuarto parámetro a considerar fue observar el aumento en el grosor de la materia blanca que se encuentra sobre el canal central, el cual tiende a ser más grueso a partir del segmento L2 hacia la parte rostral de la ME. Debido a la variabilidad entre las ratas, no todos los parámetros se cumplen de manera exacta. El segmento mejor definido entre ratas es L6, por lo que la localización de este segmento fue fundamental para determinar los demás segmentos. Tomando en cuenta todos los parámetros anteriores se determinó el número de cortes secuenciales a partir de L6 que correspondían a cada segmento; sacando un promedio se estimó que la longitud de estos es de ~ 1.6 mm (Fig. 8F), similar a lo encontrado midiendo la distancia entre raíces.

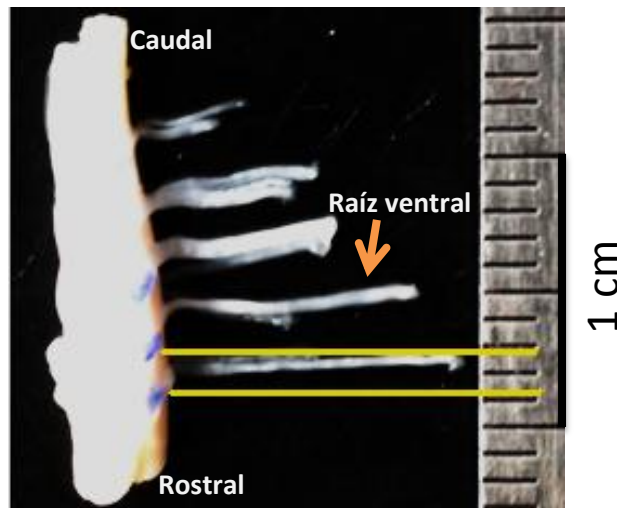


Fig. 7 Determinación de la longitud (grosor) de los segmentos lumbares de la ME en rata. Imagen representativa de la zona lumbar de la ME. Para determinar la longitud de cada segmento se midió la distancia entre raíces ventrales como se muestra con las líneas amarillas (las líneas se colocaron en el origen de la raíz marcado en azul).

Los grupos de motoneuronas son ChAT positivos

Las MNs son colinérgicas, debido a que la acetilcolina es el neurotransmisor que se libera en las terminales neuromusculares para la contracción muscular. La ChAT es la enzima que se encarga de la síntesis de este neurotransmisor, por lo que los grupos de MNs observados deben ser ChAT positivos. En la Fig. 9 se muestra que los grupos de MNs considerados para definir los segmentos y el conteo de MNs son ChAT positivos.

El AMPA difunde a los segmentos lumbares de la médula espinal

Una vez establecidos los límites de cada segmento lumbar, se llevó a cabo la determinación del daño producido por la infusión de AMPA a lo largo de los segmentos lumbares de la ME. En la Fig. 10 se compara el patrón de muerte en el lado ipsi y contra en los días 1 y 3 de tratamiento. En el día 1 del lado ipsi se observa muerte de MNs en los segmentos L5-L1, mientras que en el día 3 la pérdida de MNs en estos mismos segmentos se vuelve más severa y comienza a observarse muerte neuronal en el segmento L6. En el lado contra en el día 1 de tratamiento se observa daño solo en el segmento L4, mientras que en el día 3 ya se observa daño en los segmentos L5-L1, de manera similar al lado ipsi (Fig. 10A) (en las gráficas solo se muestra el daño hasta el segmento L2 debido a que el conteo de MNs en el segmento L1 solo se realizó en dos ratas).

Como se aprecia en las gráficas de la Fig. 10, la muerte de MNs de ambos lados (ipsi y contra) sigue un patrón similar, la diferencia entre ellos parece ser solo dependiente de la variable tiempo, ya que en el lado contra la pérdida neuronal en todos los segmentos tarda 3 días, mientras que esto ocurre desde el día 1 en el lado ipsi.

Usando el conteo de la muerte de MNs a lo largo de los segmentos en los días 1 y 3 (Fig. 10), se realizó un análisis teórico de la difusión del AMPA. En la Fig. 11A se muestra una médula a escala en donde se analizó la difusión del AMPA suponiendo que difunde de la misma manera en todas las direcciones (círculos amarillos); en este esquema también se delimitó el daño producido en el día 1 de tratamiento con AMPA (líneas lilas). Bajo la suposición que el AMPA difunde de manera

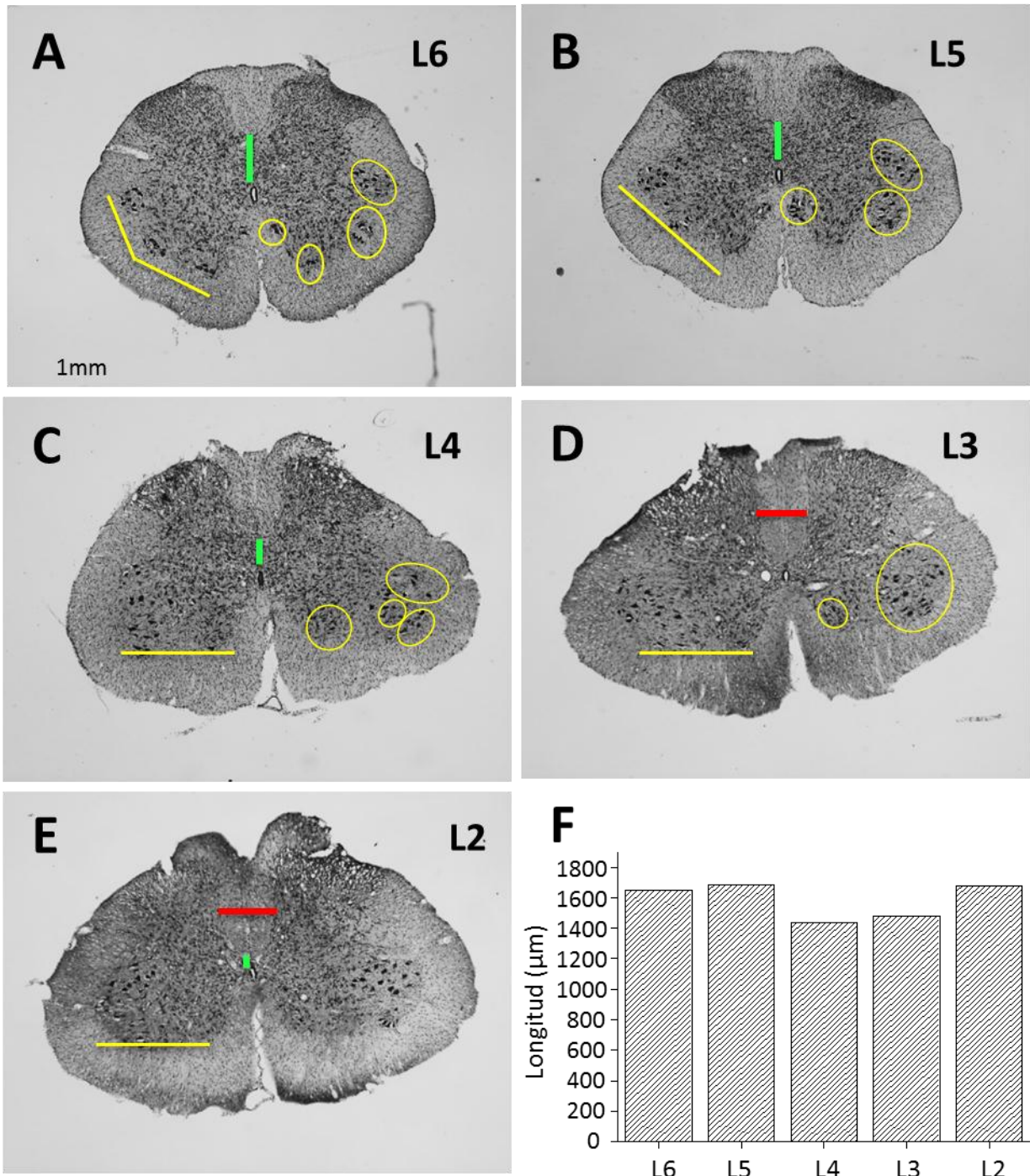


Fig. 8 Identificación de los segmentos lumbares de rata por características morfológicas. A-E Micrografías representativas de los segmentos lumbares teñidos con violeta de cresilo. Las características morfológicas para identificar cada segmento fueron: grupos de MNs (óvalos amarillos), la distancia entre el canal central y la materia blanca (línea verde), pendiente de la zona ventral (línea amarilla) y ancho de la materia blanca que se encuentra sobre el canal central (línea roja). F) se observa la longitud (grosor) promedio de cada segmento lumbar basándose en la observación de las características morfológicas de cada segmento mostradas en A-E (n=3). L6-L2 (segmentos lumbares 6-2). Nota: Las características más conservadas entre ratas se observan en L6.

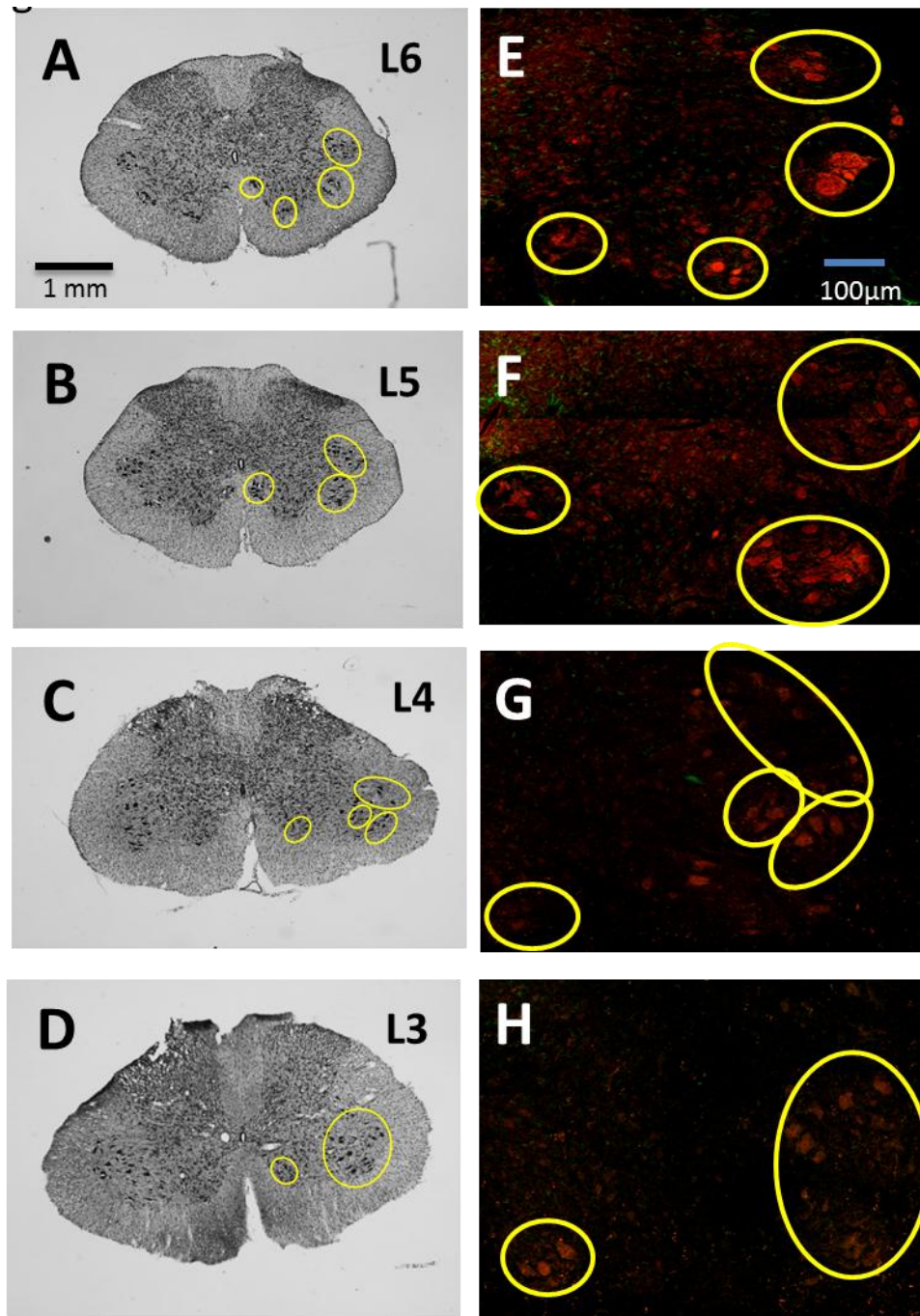
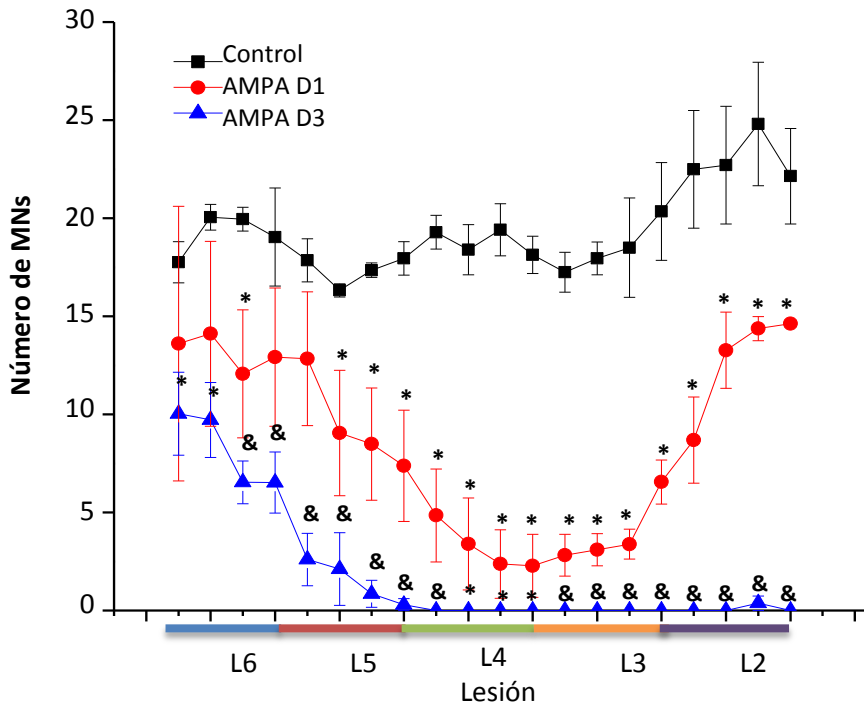


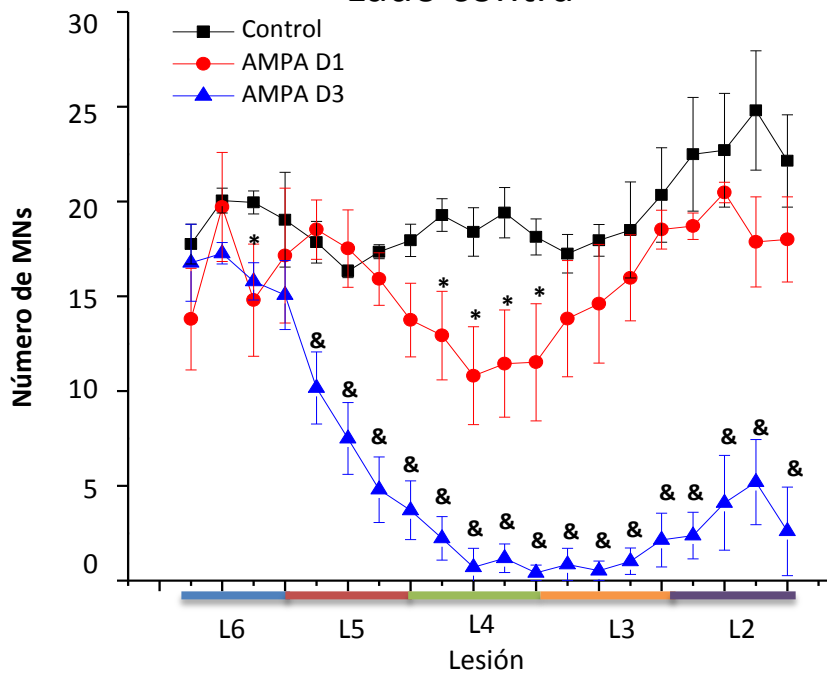
Fig. 9 Los grupos de MNs en los segmentos lumbares de rata son ChAT positivos. De A-H se muestran micrografías representativas de los segmentos lumbares de la ME. A-D) tinción de violeta de cresilo y E-H) inmunohistoquímicas para marcar MNs con ChAT (en rojo). Los cortes de A-D fueron tomados de una rata distinta a los de E-H. Los óvalos amarillos señalan los grupos de MNs característicos de cada segmento lumbar. L6-L3, segmentos lumbares.

semejante en todas las direcciones, se observa que el daño en el lado ipsi debería ser menor entre los segmentos y que el daño en el lado contra, debería ser mayor a lo encontrado según la Fig. 10. Con base en esto y a las observaciones en los patrones de muerte de MNs, proponemos un modelo teórico de difusión del AMPA para el día 1 de tratamiento (Fig. 11B).

Lado ipsi



Lado contra



Pie de figura en la siguiente hoja

Fig. 10 La muerte de las MNs producida por el AMPA sigue un gradiente caudo-rostral e ipsi-contralateral. Número de MNs a lo largo de los segmentos lumbares de la ME en el día 1 (D1) y día 3 (D3) de tratamiento con AMPA. Los datos control son el promedio del lado ipsi y contra debido a que no se encontraron diferencias; estos controles también fueron utilizados para la Fig. 19. Cada punto representa el promedio \pm EE de MNs en 10 cortes secuenciales de 40 μ m partiendo del segmento L6 en 5 ratas por grupo. *, representa diferencia significativa contra el control y &, diferencia contra el control y el D1 ($p=0.001$).

En este modelo postulamos que la difusión longitudinal del AMPA del lado ipsi es mayor respecto al lado contra y como puede observarse proponemos que la difusión al lado contra solo ocurre a partir del sitio del implante, debido a que la concentración más alta de AMPA se encuentra en esta zona. Una vez que el AMPA ha logrado difundir hacia el lado contra, creemos que la difusión hacia los segmentos lumbares ocurre de manera similar al lado ipsi.

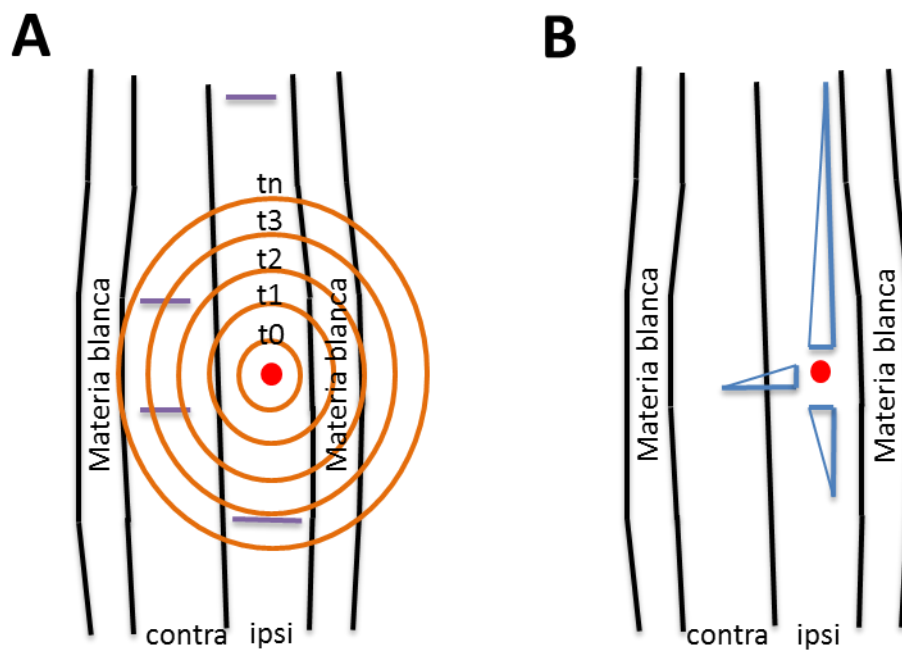


Fig. 11 Modelo teórico de la difusión del AMPA a través de los segmentos lumbares con base en la Figura 10. En A y B se observa un esquema que representa un corte longitudinal de la ME a escala de la región lumbar. El punto rojo representa el sitio donde se coloca la cánula. En A) se trazaron líneas lilas que limitan la región de daño producido por AMPA en el día 1 de tratamiento, los círculos amarillos representan la difusión del AMPA suponiendo que puede difundir de la misma manera en todas las direcciones; cada círculo corresponde a un tiempo diferente después del implante (el tiempo 0 es al momento de colocar el implante). En B) se observa un modelo teórico propuesto para explicar la difusión del AMPA correspondiente al día 1. En este modelo proponemos que el AMPA difunde más rápido hacia la región rostral comparado con la región caudal y que la difusión hacia el lado contra solamente ocurre a partir del sitio donde se coloca la cánula (Fig. 9). Para detalles ver texto. ∇ gradiente.

Para explicar el retraso de la difusión del AMPA hacia el lado contra en nuestro modelo teórico, proponemos dos posibilidades. La primera de ellas es que las células de la lámina X que rodean al canal central (conexión de lado ipsi-contra), puedan tener características que retrasen la difusión del AMPA (Molander et al., 1984). Otra de las posibilidades es que, más que la existencia de obstáculos para el paso del AMPA al lado contra, la rápida difusión intersegmental del lado ipsi podría deberse a que las MNs forman columnas a lo largo de los segmentos y que por lo tanto se encuentran en constante comunicación (Kaizawas y Takahashi, 1970). Esta explicación también está apoyada en el hecho de que una vez que el AMPA difunde hacia el lado contra, la muerte de las MNs ocurre de manera similar al lado ipsi.

Otra característica interesante que se observó en la distribución de la muerte de MNs es que, aunque la cánula se coloca en el segmento L4, el daño se extiende hasta el segmento L1 (rostral) y solo hasta el segmento L6 (caudal). Esta observación puede deberse a que las subunidades del receptor AMPA (en especial GluR2, subunidad que determina la permeabilidad a calcio como ya se ha mencionado), son distribuidas diferencialmente entre los segmentos lumbares de la ME, y que por lo tanto, la susceptibilidad a AMPA de las MNs en los segmentos lumbares caudales sea menor que en los segmentos lumbares rostrales. En el segmento torácico-lumbar (T12-L1) de la ME se ha observado por medio de inmunohistoquímicas que en el asta dorsal se expresan las subunidades GluR 1, 2 y 3 y que en el asta ventral se expresan GluR 2, 3 y 4 (Nazli et al., 2000). De manera similar, otro grupo observó que en los segmentos lumbares L5-L6 las subunidades GluR 1 y 2 se expresan en el asta dorsal, mientras que en el asta ventral se expresan GluR 1, 2 y 3 (Chambille y Rampin, 2002). Estos resultados en conjunto sugieren que en la ME existe una expresión diferencial de las subunidades del receptor AMPA, sin embargo debido a que no se observa una comparación entre los segmentos lumbares, es difícil llegar a conclusiones precisas.

A pesar de que no podemos concluir de manera definitiva como difunde el AMPA, creemos que más de un fenómeno está implicado y que el conjunto de las características de las células de la ME, puedan determinar la difusión del AMPA.

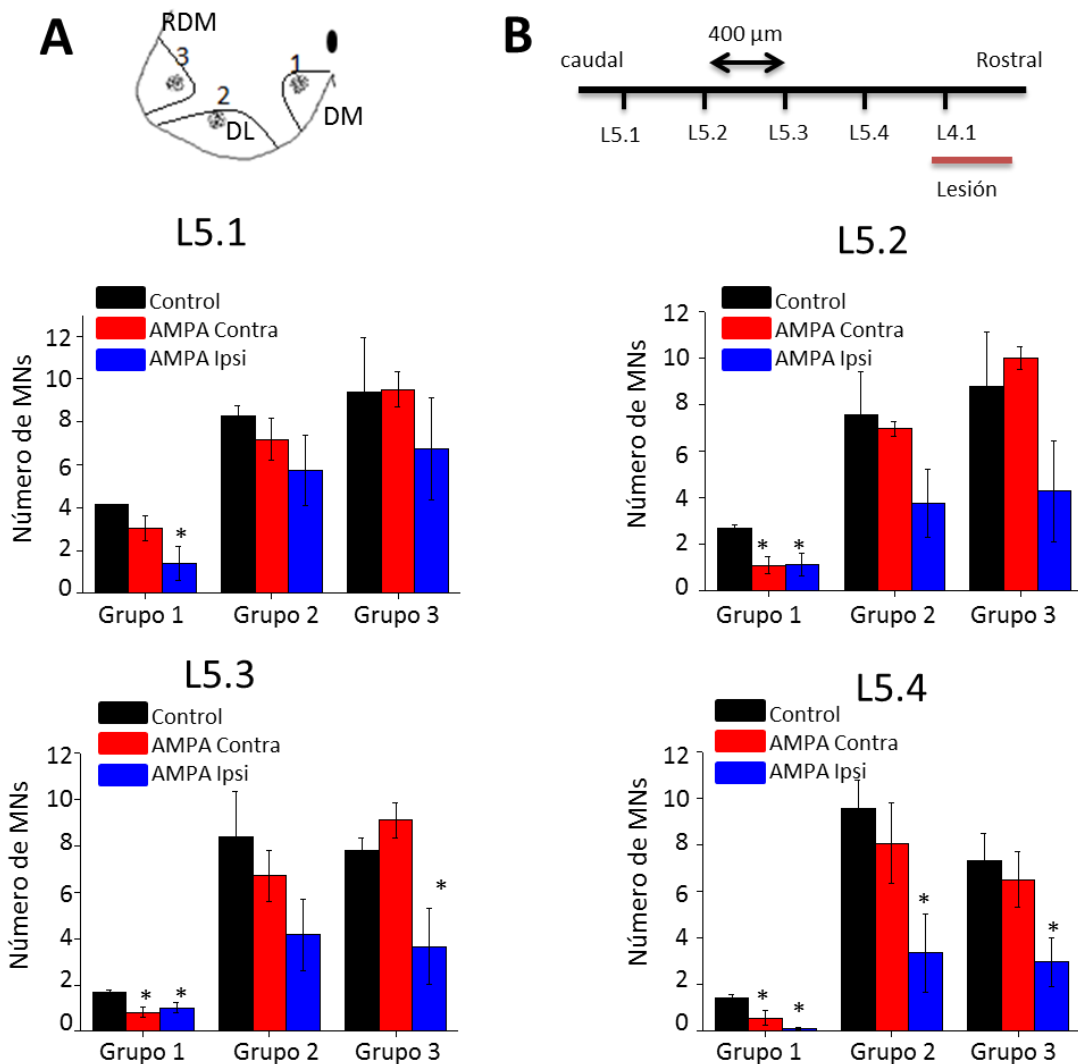
Vulnerabilidad de grupos de motoneuronas a AMPA

Debido al patrón de muerte observado en el día 1 de tratamiento con AMPA, en donde se aprecia muerte neuronal a lo largo de los segmentos, se pensó que ciertos grupos de MNs podrían ser más susceptibles que otros a la exposición de AMPA. Para llevar a cabo este análisis se localizaron los grupos de MNs mejor conservados entre ratas en los segmentos L5-L3 (segmentos mas cercanos al sitio del implante). Para este análisis se consideraron tres zonas importantes en la médula, la dorsomedial, la dorsolateral y la retrodorsomedial, como se muestra en la Fig. 12A.

Para este estudio, en el segmento L5 se consideraron tres grupos de MNs (Fig. 12A). En L5.1 (región más alejada del sitio del implante) se observó daño solo en el grupo 1 tanto en el lado ipsi como en el contra, en los subsegmentos más cercanos al sitio de lesión (L5.3 y L5.4) además se observo daño en los grupos 2 y 3 (solo del lado ipsi). Estos resultados en conjunto sugieren que el grupo 1 del segmento L5 resulta más vulnerable al AMPA comparado con los otros dos grupos. En el segmento L4 no se encontraron cambios con respecto al control en los grupos 1 y 2 en ninguno de los subsegmentos, mientras que en los grupos 3 y 4 en el lado ipsi se ven altamente afectados en todos los subsegmentos; en el lado contra solo se obtuvo un cambio significativo en el grupo 3 en la parte L4.3. Para este segmento, el grupo 3 es el primero en perder MNs. El análisis para los grupos 1 y 2 de este segmento es ineficiente debido a que estos grupos contienen solo una o dos MNs por lo que no podemos concluir nada respecto a ellos (Fig. 13). Para el análisis en el

segmento L3 solo se consideraron dos grupos debido a que las MNs de la zona dorsolateral de la ME no tienen una distribución tan conservada entre ratas. En el grupo 1 se observa pérdida de MNs tanto en el lado ipsi como contra (Fig. 14); el grupo 2 no tuvo cambios significativos pero se tiene el mismo problema de muy pocas MNs.

Las conclusiones para este análisis resultan complicadas de interpretar debido a la existencia de grupos con una cantidad de MNs muy pequeñas. Sin embargo, analizando los grupos con mayor número de MNs se observa una tendencia de pérdida primeramente para los grupos que se encuentran en la región dorsolateral, seguidos de los grupos localizados en la región retradorsomedial. La región dorsomedial que es la más cercana al canal central es la que contiene los grupos con pocas MNs, por lo que no podemos concluir nada al respecto. La tendencia de muerte que proponemos según nuestros resultados no nos permiten saber si existe cierta vulnerabilidad de los grupos dorsolaterales con respecto a los retradorsomediales al AMPA, más bien esta tendencia podría ser explicada por la difusión del AMPA, donde los grupos mas alejados como los retradorsomediales son afectados al final como se discutió en el análisis teórico de difusión.



Pie de figura en la siguiente hoja

Fig. 12 Análisis de la muerte de MNs por grupos y por subsegmentos en el segmento L5. En el esquema A se señalan los tres grupos de MNs considerados en el segmento, localizados en las regiones retrodorsomedial (RDM), dorsolateral (DL) y dorsomedial (DM) del asta ventral. El esquema B muestra los subsegmentos analizados, con relación al sitio del implante. En las gráficas se observan los datos por grupo y por subsegmentos, como se indica. Las cifras son el promedio \pm EE de 10 cortes secuenciales de 40 μ m en el día 1 de tratamiento con AMPA (n=5). Para el valor control se promedió el lado ipsi y contra debido a que no se encontraron diferencias. *, diferencia significativa contra el control (p=0.001).

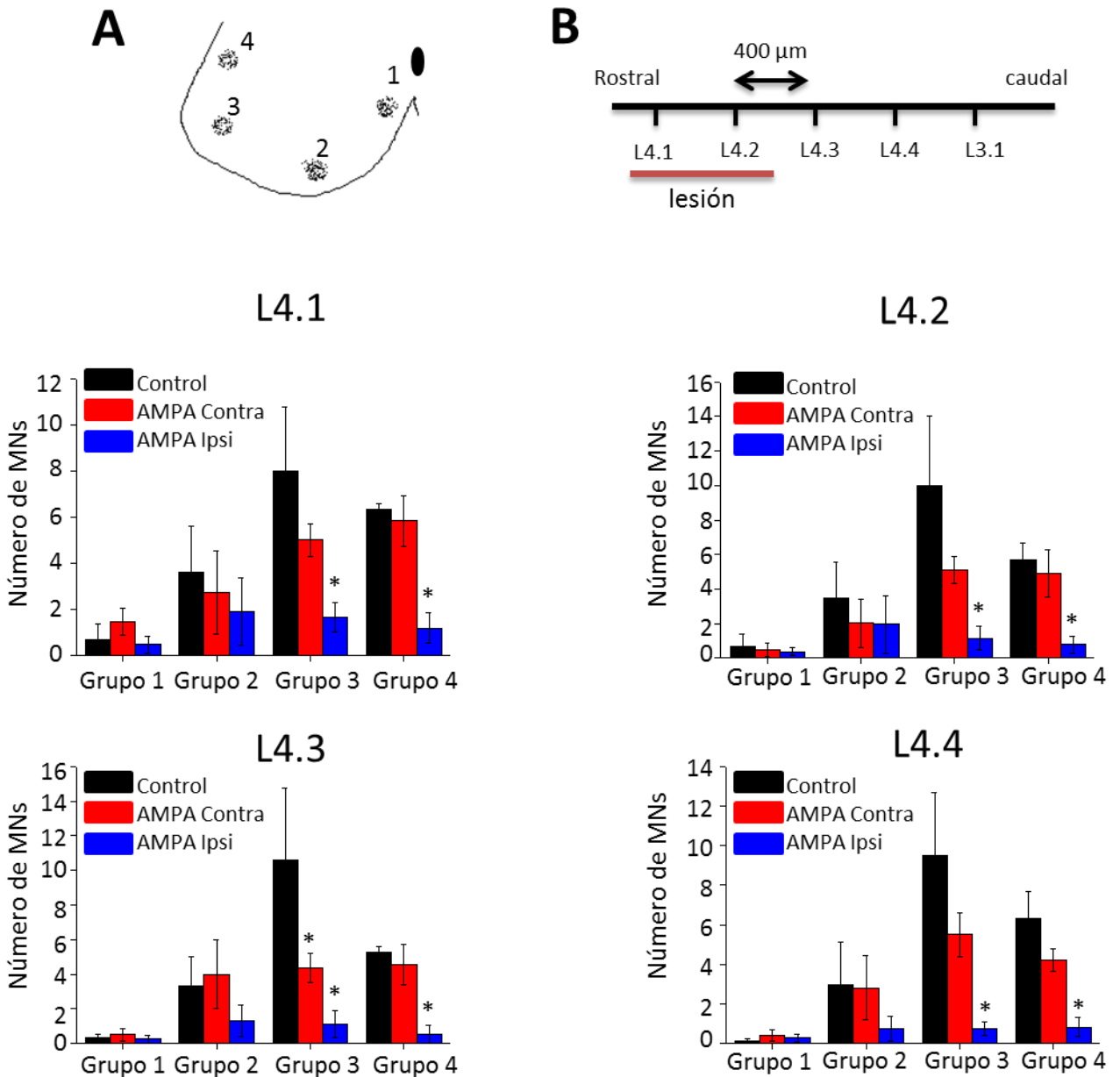


Fig. 13 Análisis de la muerte de MNs por grupos y por subsegmentos en el segmento L4. En el esquema A se señalan los cuatro grupos de MNs considerados en el segmento. El esquema B muestra los subsegmentos analizados, con relación al sitio del implante. En las gráficas se observan los datos por grupo y por subsegmentos, como se indica. Las cifras son el promedio \pm EE de 10 cortes secuenciales de 40 μ m en el día 1 de tratamiento con AMPA (n=5). Para el valor control se promedió el lado ipsi y contra debido a que no se encontraron diferencias. *, diferencia significativa contra el control (p=0.001).

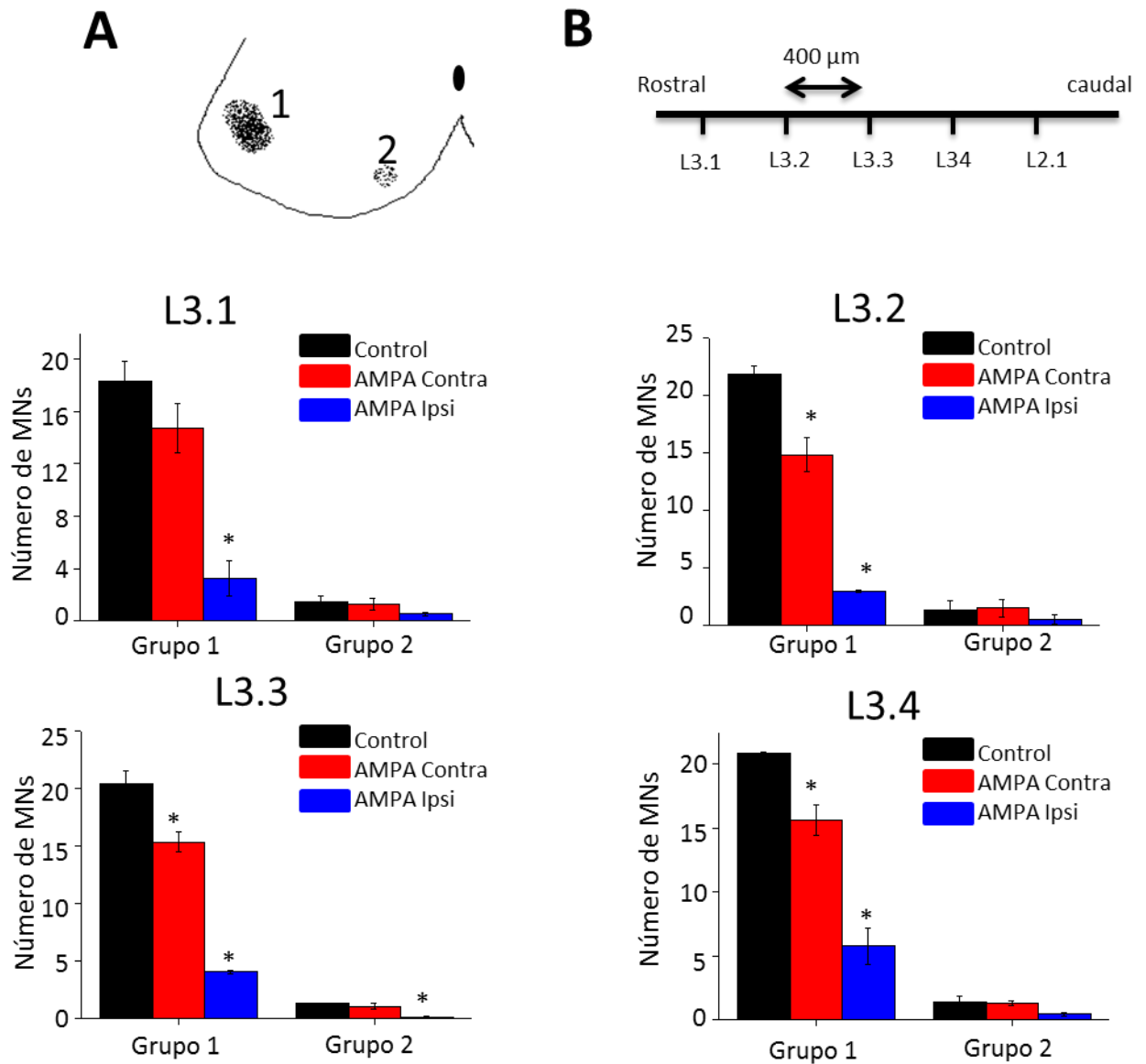


Fig. 14 Análisis de la muerte de MNs por grupos y por subsegmentos en el segmento L3. En el esquema A se señalan los dos grupos de MNs considerados en el segmento. El esquema B muestra los subsegmentos analizados, con relación al sitio del implante. En las gráficas se observan los datos por grupo y por subsegmentos, como se indica. Las cifras son el promedio \pm EE de 10 cortes secuenciales de 40 μ m en el día 1 de tratamiento (n=5). Para el valor control se promedió el lado ipsi y contra debido a que no se encontraron diferencias. *, diferencia significativa contra el control (p=0.001).

Análisis teórico de la parálisis por la actividad excitotóxica del AMPA y su relación con la pérdida de función muscular

La parálisis producida por AMPA en nuestro modelo sigue siempre el mismo patrón, que puede dividirse en las etapas mostradas en la Tabla 3. A continuación proponemos una explicación para el progreso de la parálisis relacionándola con la pérdida de función muscular.

Tabla 3. Etapas de la parálisis producida por la infusión de AMPA

	Observaciones
Etapa 1 <ul style="list-style-type: none">• Equivalente a la extremidad contra en el día 1 de tratamiento.	En esta etapa se observa que la parálisis comienza en los dedos de la pata, no obstante la rata todavía tiene movilidad en la pierna y el muslo.
Etapa 2 <ul style="list-style-type: none">• Equivalente a la extremidad ipsi en el día 1 de tratamiento.	En esta etapa se observa que la extremidad de la rata ya ha perdido la movilidad casi completamente: la parálisis se observa en la pierna y la pata. Los músculos del muslo no están paralizados.
Etapa 3 <ul style="list-style-type: none">• Equivalente a la extremidad ipsi en el día 3 de tratamiento.	En esta etapa la extremidad completa se encuentra paralizada, la pérdida de función muscular se observa en la pata, la pierna y el muslo.

Debido a que cada columna de MNs se le relaciona con la inervación de un determinado músculo y que pueden estar distribuidas en más de un segmento lumbar, la pérdida de función de un músculo dependerá de la cantidad de MNs afectadas a lo largo de toda su columna. Para este análisis se eligieron músculos y grupos de músculos clave en el funcionamiento de la extremidad.

En la etapa 1 de la parálisis (Tabla 3), el primer suceso observado es la pérdida de función de los dedos de la extremidad (equivalente a la extremidad contra al día 1; Fig. 9). Esta pérdida correspondería principalmente a los grupos de músculos flexores y extensores. De acuerdo con la Tabla 2, la inervación de estos grupos de músculos corresponde principalmente a los segmentos L5-L4, los cuales por cercanía a la cánula son los primeros que exponen al AMPA. A pesar de que los músculos tríceps y glúteo también están inervados por L4, la columna de MNs que inerva estos músculos se extiende hasta el segmento L6, lo que compensaría la falta de MNs en L4 en la etapa temprana de la parálisis (nótese que la muerte de MNs caudalmente es menor comparada con la zona rostral, Fig. 10). La segunda etapa de parálisis mostrada en la Tabla 3 describe cómo la rata ha perdido casi por completo la movilidad de la extremidad, aunque aún tiene movilidad del muslo. En esta etapa la extremidad equivale al lado ipsi en el día 1, justo cuando la muerte de MNs se ha extendido a los segmentos L5-L2 (Fig. 10). Según la Tabla 2, los músculos afectados por la

pérdida de MNs en estos segmentos afectarían principalmente a los grupos de músculos flexores, extensores y tríceps y en menor proporción a glúteo, aductores, psoas y cuádriceps (estos últimos tres son parte del muslo). En la etapa final de la parálisis de la extremidad ya se observa la pérdida total de movilidad, esta etapa equivaldría al día 3 del lado ipsi donde ya se encuentran todos los segmentos lumbares dañados (Fig. 10) y por lo tanto ya se observa la pérdida de función total de los grupos de músculos flexores, extensores, tríceps, aductores, psoas, cuádriceps y glúteo.

Este análisis teórico nos explica como ocurre la parálisis en nuestro modelo relacionando la pérdida de MNs a lo largo de los segmentos y la pérdida de función muscular. Estos datos nos abren un panorama que nos permite conocer más nuestro modelo y así poder explicar a futuro resultados experimentales con mayor exactitud.

Efecto de la apocinina sobre la acción excitotóxica del AMPA

Para evaluar la participación de las NOXs en el mecanismo de muerte por infusión de AMPA, se utilizó APO, un inhibidor de esta enzima que no permite que interaccionen las subunidades membranales y citosólicas, impidiendo así la activación de la enzima (Stefanska y Pawliczak, 2008).

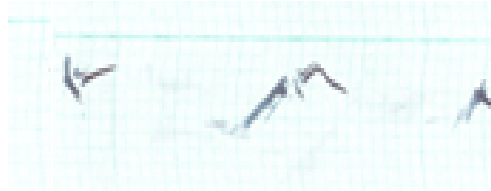
Coaplicando AMPA y APO 10 mM no se encontraron cambios significativos en la conducta motora medida en rotarod, PGE y registro de huellas ni en el conteo de MNs (Fig. 15, 16 y 17) comparadas con el control de AMPA solo. Sin embargo, cuando se aumentó la dosis de APO a 30 y 60 mM, las ratas fueron capaces de realizar la prueba del PGE (Fig. 16B), lo cual correlacionado con que aún tenían movimiento de la extremidad contralateral como lo muestra el registro de huellas (Fig. 15). En la prueba del rotarod no se encontraron diferencias en ninguna de las tres concentraciones de APO utilizadas con respecto a las ratas tratadas solo con AMPA (Fig. 16A).

El conteo de MNs realizado en el sitio del implante (L4-L5) se muestra en la Fig. 17. En esta gráfica se observa una pérdida de MNs similar en el lado ipsi y contra tanto del grupo control de AMPA como de los grupos tratados con AMPA/APO (10, 20, 30 mM).

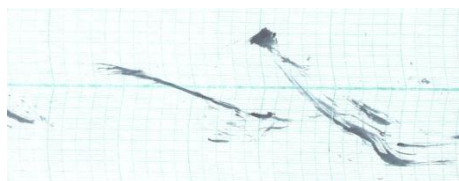
Debido a que los grupos de AMPA/APO 30 y 60 mM aún pueden realizar la prueba del PGE y que en el conteo de MNs realizado en el sitio del implante no se observó un cambio con respecto al grupo de AMPA solo (basados en los datos de la sección anterior), se realizó el conteo de MNs a lo largo de los segmentos L6-L2. Debido a la similitud en las pruebas motoras entre los grupos AMPA/APO 30 y 60 mM, se decidió solo utilizar la concentración de 30 mM para el conteo de MNs a lo largo de los segmentos; para el caso de 60 mM solo se contabilizó una rata en los segmentos L5-L2 y mostró cifras parecidas a la concentración de 30 mM. Como se muestra en las Figs. 18 y 20, en el lado ipsi no se encuentran diferencias significativas en el número de MNs sanas, comparando el grupo tratado con AMPA/APO 30 mM y AMPA solo: las MNs de los segmentos L6-L2 se han perdido completamente, correlacionado con la parálisis completa de la extremidad. Por el contrario, en el lado contra el grupo tratado con AMPA/APO 30 mM muestra un mayor número de MNs en los segmentos L4-L2 comparado con el control de AMPA (Fig. 19 y 20 (lado contra)). Este número de MNs se encuentra por debajo de la mitad comparado con el control, sin embargo parece ser suficiente para poder realizar la prueba del PGE; además de que para realizar esta prueba solo se requiere la fuerza para un impulso (dada por la extremidad contra), a diferencia del rotarod en donde además de la fuerza requerida también se necesita coordinación. Las MNs que todavía se observan en el lado contra corresponden a los grupos musculares cuádriceps y aductores, grupos de músculos que se encuentran en el muslo de la extremidad y que podrían ser los responsables de que la rata aun pueda realizar la prueba del PGE. Las ratas tratadas con

AMPA/APO 30 mM en el día 4, no mostraron diferencias en las pruebas motoras con respecto a AMPA solo (datos no mostrados), lo que sugiere que más que una protección ocurre un retraso en la parálisis.

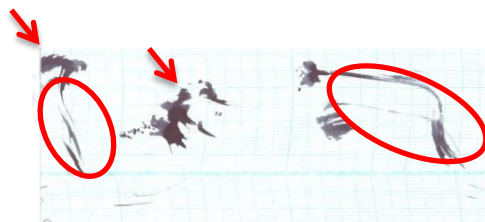
AMPA



AMPA/APO (10mM)



AMPA/APO (30mM)



AMPA/APO (60mM)

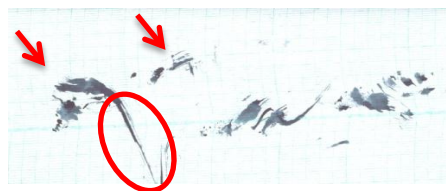


Fig. 15 La APO retrasa el progreso de la parálisis producida por el AMPA. En esta figura se observa un registro de huellas representativo en el día 3 de tratamiento con AMPA y AMPA/APO 10, 30 y 60 mM. Las flechas señalan el registro de la extremidad contra y los círculos a la extremidad ipsi. Nótese que en AMPA y AMPA/APO 10 mM solo se observa un arrastre de ambas extremidades sin poder identificar a cada una de ellas.

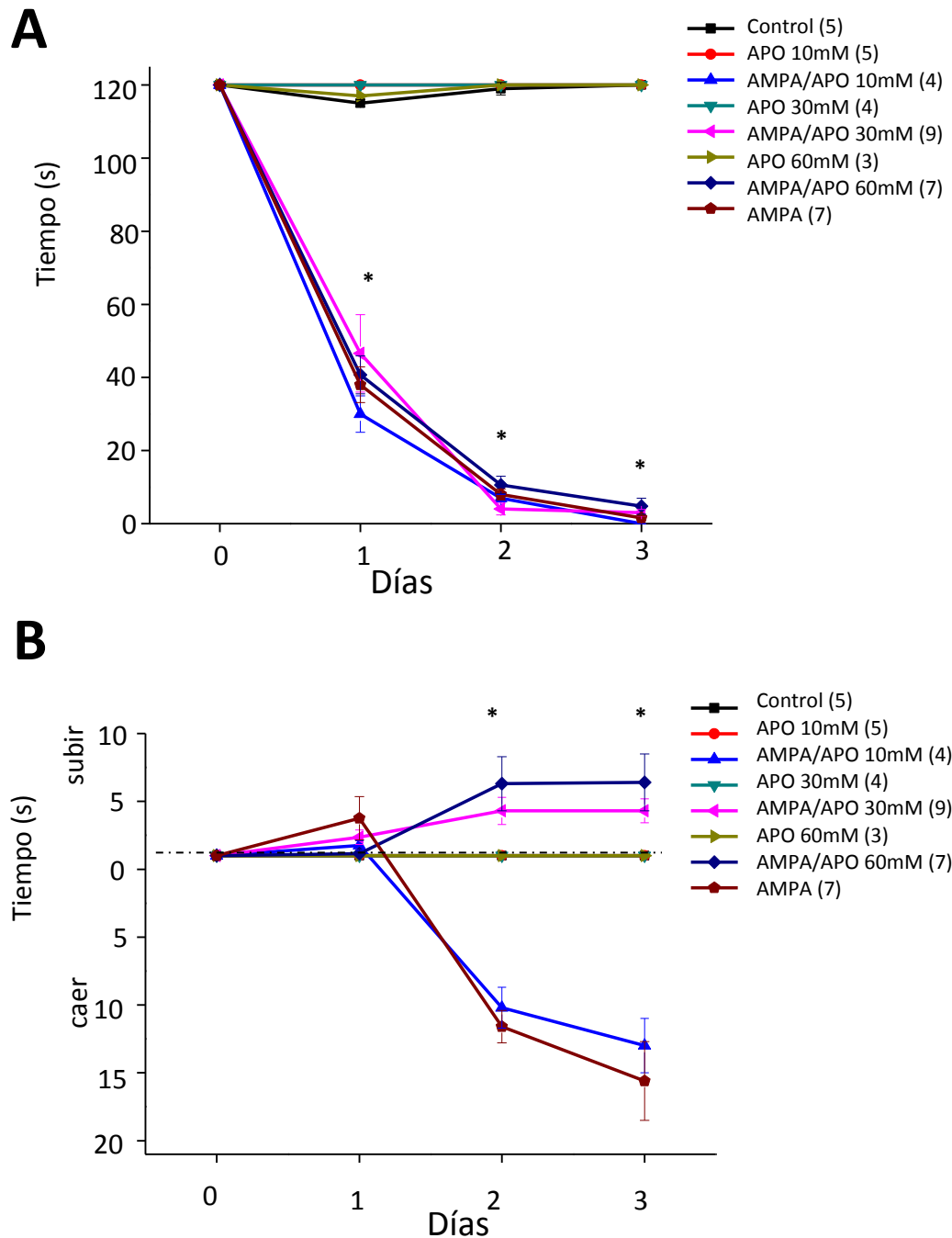


Fig. 16 La APO retrasa el déficit motor producido por el AMPA. A) Prueba de rotarod y B) prueba de PGE. Cada punto representa el promedio \pm EE del número de ratas mostrado en paréntesis. Nótese que la infusión de APO sola no mostró ninguna diferencia comparando con el control. *, diferencia significativa contra el control ($p= 0.001$). En rotarod no hubo diferencia significativa entre los grupos tratados con AMPA/APO y el grupo de AMPA.

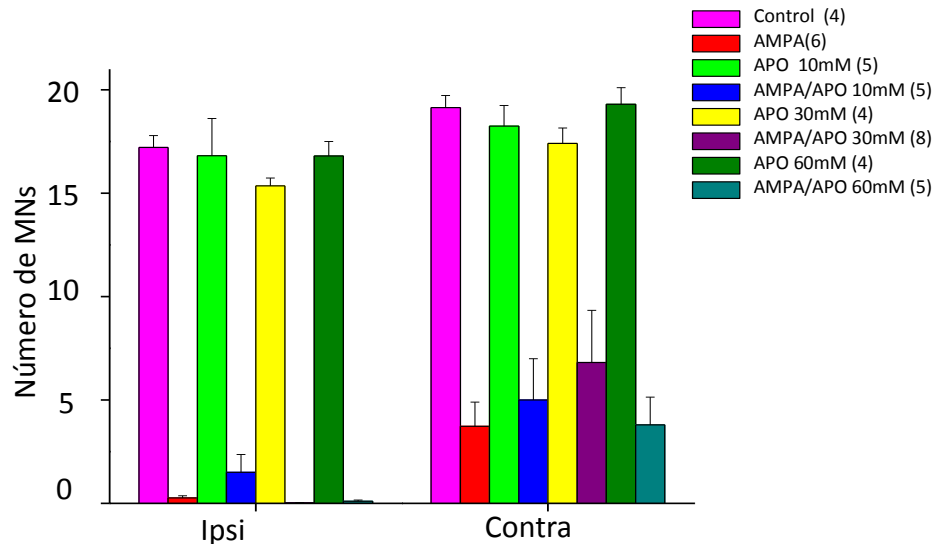


Fig. 17 La APO no protege a las MNs de la muerte provocada el AMPA en el sitio de implante.

Número de MNs en el sitio del implante (L5-L4) en el día 3 de tratamiento. Nótese que la infusión de APO sola no mostró ninguna diferencia comparando con el control. El conteo corresponde al promedio \pm EE de las MNs localizadas en el sitio del implante (el número de ratas utilizado en cada grupo se muestra en paréntesis). *, diferencia significativa contra el control ($p= 0.001$). No hubo diferencia significativa entre los grupos tratados con AMPA/APO y el grupo de AMPA, sin embargo, como se observa en las figuras 17-19, en los segmentos adyacentes al sitio del implante si se observaron diferencias.

Debido a que el conteo de MNs en los grupos tratados con AMPA/APO 30 y 60 mM solo muestran un mayor número de MNs en el lado contra con respecto a AMPA y no observamos cambios en el lado ipsi, pensamos que este efecto podría deberse a dos posibilidades; la primera es que la APO difunda más rápido hacia el lado contra e inhiba a las NOXs, protegiendo a las MNs y la segunda opción, es que debido a las propiedades hidrofóbicas de la APO, altas concentraciones puedan estar formando agregados en la zona de lesión y esto retrase la difusión del AMPA hacia el lado contra. Para poder descartar la primera de las posibilidades, se inyectó diariamente i.p. APO 25 mg/kg/día cuatro días previos al implante de una bomba solo con AMPA y dos días después (ya esta documentado que la APO atraviesa la barrera hematoencefálica debido a su carácter hidrofóbico (Trumbull et al., 2012)). Como se muestra en la Fig. 21 y 22 la APO inyectada i.p. previamente a la administración de AMPA no tuvo un efecto protector en las pruebas conductuales de rotarod, PGE y registro de huellas ni en el conteo de MNs en los segmentos L4-L3 comparado al control de AMPA, lo que sugiere que la posible inhibición de las NOXs por APO, si es que sucede, no ejerce ningún efecto protector.

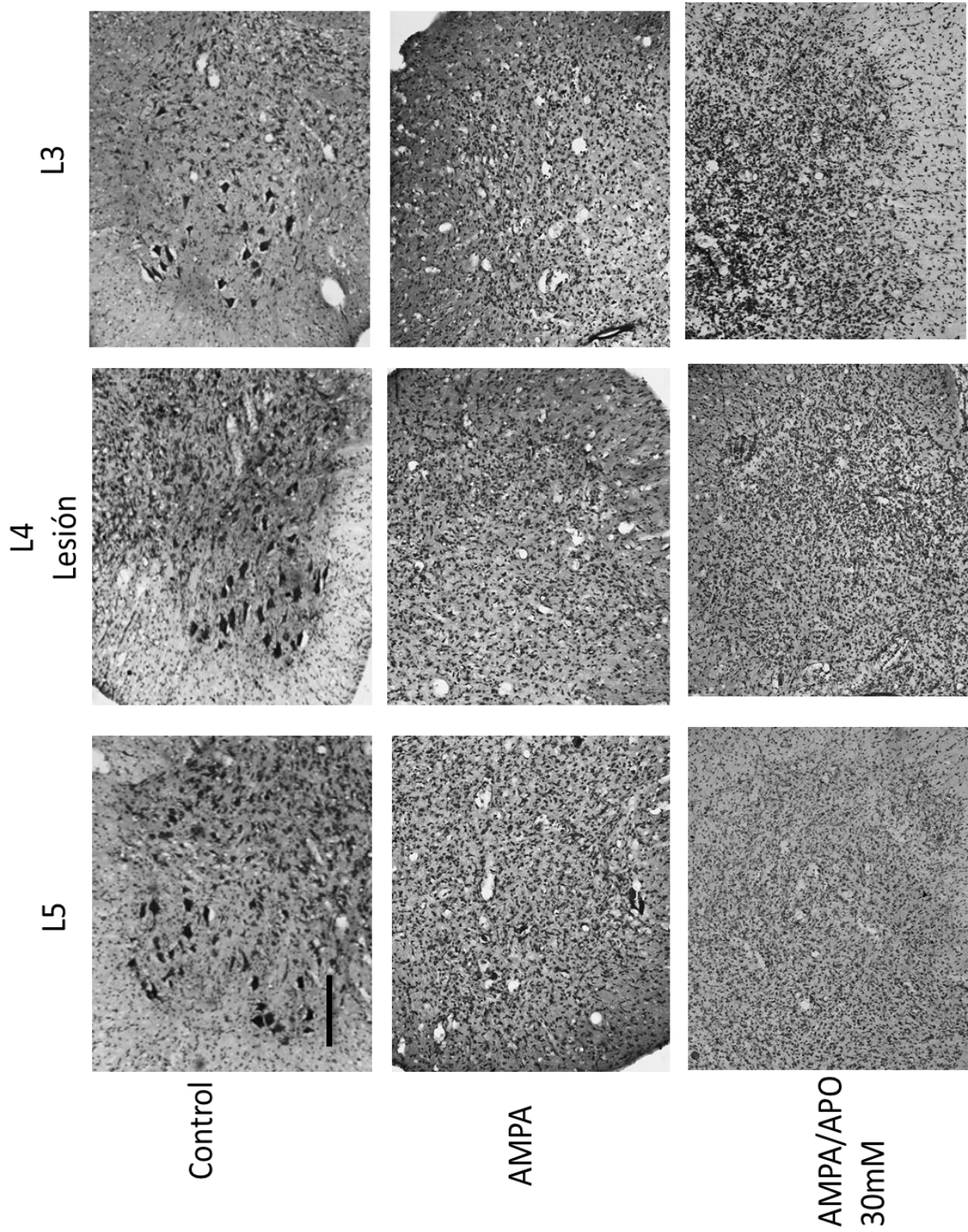


Fig. 18 En el lado del implante la APO no protege a las MNs de la muerte causada por el tratamiento de AMPA. Micrografías representativas del asta ventral de la ME (tinción con violeta de cresilo) en el día 3 de tratamiento en los segmentos L5-L3. Escala =200 μ m.

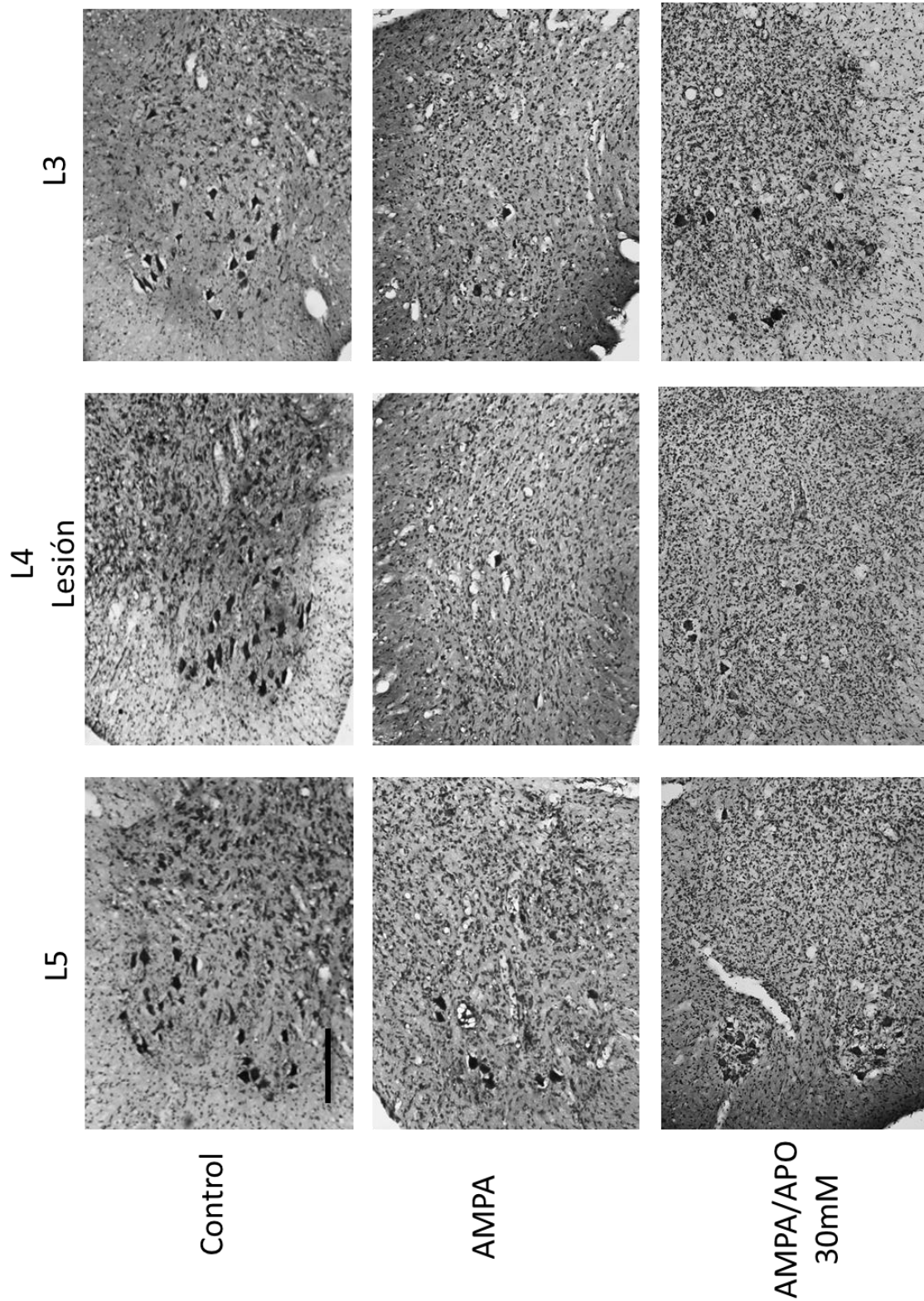


Fig. 19 En el lado contralateral al implante la APO retrasa la muerte de las MNs causada por el tratamiento de AMPA. Micrografías representativas del asta ventral de la ME (tinción con violeta de cresilo) en el día 3 de tratamiento en los segmentos L5-L3. Escala = 200 μ m.

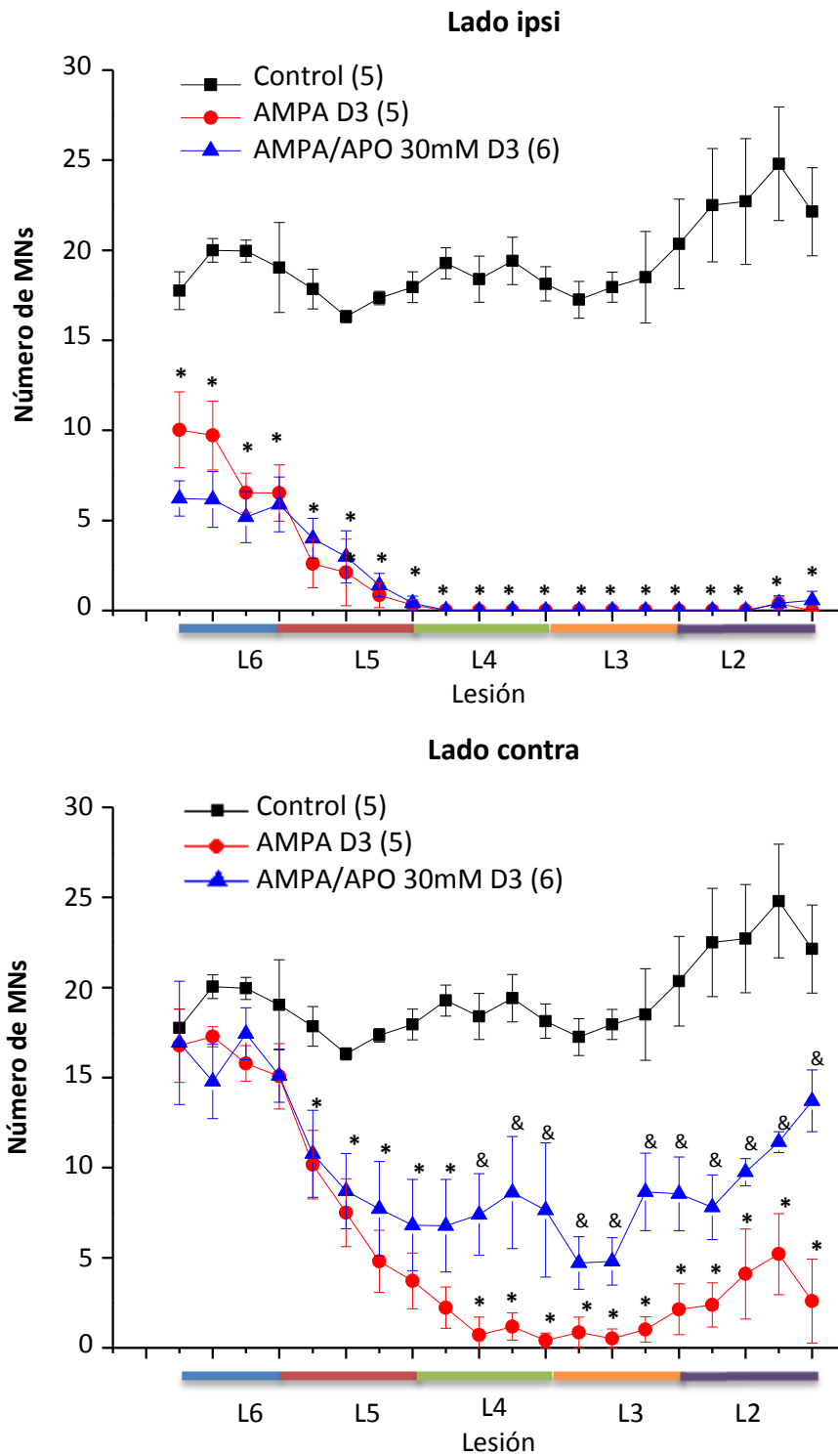


Fig. 20 La APO retrasa la muerte de MNs producida por el AMPA en los segmentos adyacentes al sitio del implante. Número de MNs observadas a lo largo de los segmentos lumbares en el día 3 de tratamiento. Para el valor control se promedió el lado ipsi y contra debido a que no se encontraron diferencias. Cada punto es el promedio \pm EE de 10 cortes secuenciales de 40 μ m partiendo del segmento L6. *, diferencia significativa contra el control y &, diferencia contra el control y el AMPA($p=0.001$).

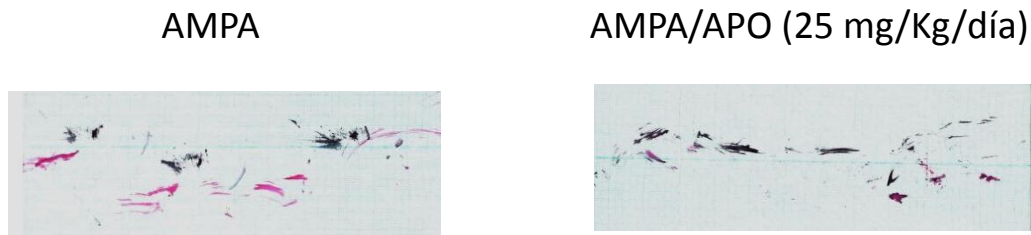
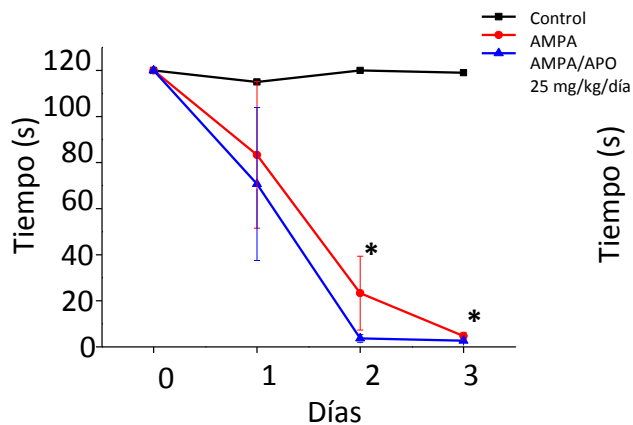
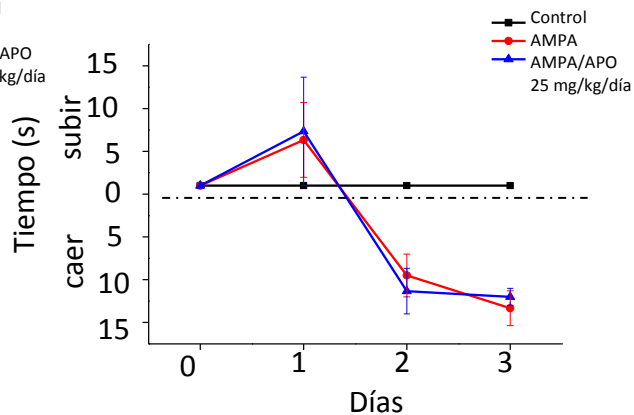
A**B****C**

Fig. 21 La administración previa i.p de APO no modifica las alteraciones motoras producidas por el AMPA. Se inyectó 25 mg/kg de APO i.p. diariamente por seis días, cuatro días antes del implante de la minibomba con AMPA y dos días después. A) Registro de huellas representativo al día 3 de tratamiento. B) prueba de rotarod y C) prueba de PGE. Cada punto representa el promedio \pm EE de 3 ratas por grupo. *, diferencia significativa contra el control ($p=0.001$). No hubo diferencia significativa contra el grupo de AMPA.

En relación con esta conclusión, en el modelo experimental de ALS familiar con la mutación en $SOD1^{G93A}$, dos grupos de investigación han propuesto a las NOXs como enzimas clave que participan en generar la muerte de las MNs (Wu et al., 2006; Marden et al., 2007; Harraz et al., 2008). Estos grupos por medio del tratamiento con APO (administrándola en el agua de beber) y por la delección de la subunidad $gp91^{phox}$ observaron la extensión de la vida de los ratones. Sin embargo, el grupo de Trumbull et al., 2012 sugiere que las NOXs no son enzimas importantes en el proceso de neurodegeneración, ya que utilizando también el ratón con la mutación $SOD1^{G93A}$ y usando APO y diAPO (en el agua de beber), no observaron una mejoría de sus ratones tratados respecto a sus controles.

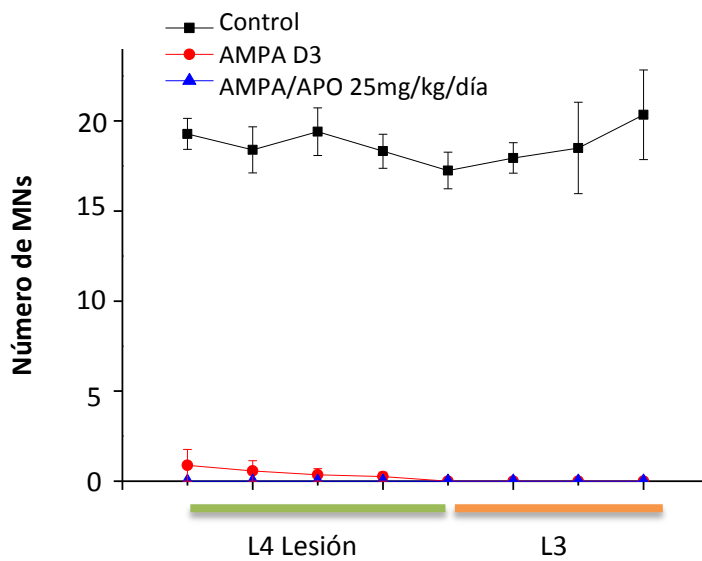
Por otro lado experimentos inhibiendo la actividad de las NOXs, han sugerido que estas enzimas participan en generar la muerte neuronal producida por excitotoxicidad. En experimentos *in vitro* se ha observado que la producción de ROS, inducida por el tratamiento con NMDA en cultivos de neuronas corticales, disminuye cuando se aplica APO o 6-aminonicotinamida (inhibidor de la vía de las pentosas, vía generadora de NADPH) (Brennan et al., 2009). En experimentos *in vivo*, la aplicación de APO disminuye la muerte de neuronas producida por la inyección de NMDA en hipocampo (Brennan et al., 2009). En ratones knockout de NOX2 el daño producido por la

inyección de glutamato en estriado es menor al observado en ratones control (Guemez-Gamboa et al., 2011). La diferencia de estos resultados con los nuestros, puede explicarse por las diferencias estructurales y fisiológicas entre las regiones del cerebro estudiadas y la ME.

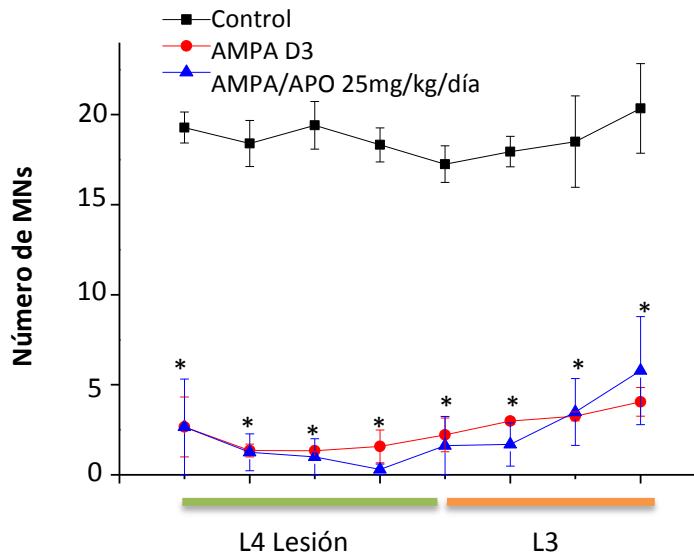
El conjunto de nuestros resultados sugiere que las NOXs no participan de manera primordial en generar la muerte de las MNs por la infusión de AMPA en la ME, debido a que el tratamiento con APO no protege de la neurodegeneración ni de la parálisis, apoyando los resultados del trabajo de Trumbull et al., (2012). Concluimos que la protección motora en el lado contra ejercida por la APO 30 y 60 mM podría deberse a una difusión más restringida del AMPA en el tejido en presencia de altas concentraciones de APO, más que a una protección por la inhibición de las NOXs.

Nuestros resultados también sugieren que se requiere de un mayor número de estudios para poder entender el papel de las NOXs en el proceso de neurodegeneración de la ALS, y que la inhibición de estas enzimas como un posible tratamiento todavía no debe considerarse.

Lado ipsi



Lado contra



Pie de figura en la siguiente hoja

Fig. 22 La administración previa i.p de APO no modifica la muerte de MNs causada por el AMPA. Las ratas se trataron con 25 mg/kg de APO i.p. diariamente por seis días, cuatro días antes del implante de la minibomba con AMPA y dos días después. En conteo de MNs se realizó en los segmentos L4 y L3 en el día 3 de tratamiento. Cada punto representa el promedio \pm EE del número de MNs observadas en 10 cortes secuenciales de 40 μ m partiendo del sitio del implante (n=3).*, diferencia significativa contra el control (p= 0.001). No hubo diferencia significativa contra el grupo de AMPA.

CONCLUSIONES

I.- Como había sido reportado, la infusión crónica de AMPA en ME produce muerte de MNs y genera déficit motor. Esta reproducción del modelo nos permitió ampliar y detallar el efecto del AMPA, lo que nos llevó a las siguientes conclusiones:

Ia.- La muerte de MNs en nuestro modelo se extiende a todos los segmentos lumbares de la ME.

Ib.- La muerte de MNs hacia los segmentos rostrales es mayor comparada con los segmentos caudales.

Ic.- La parálisis producida en nuestro modelo esta relacionada con la pérdida de función de los grupos musculares flexores y extensores en una etapa temprana, seguidos de los grupos tríceps y en última instancia de los grupos glúteo, aductores, psoas y cuádriceps (según nuestro análisis teórico).

II.- El tratamiento con APO, no retrasa el déficit motor ni la muerte de las MNs producido por el tratamiento con AMPA en ME. Con estos experimentos también podemos concluir lo siguiente:

IIa.- Los grupos musculares cuádriceps y aductores son necesarios para realizar la prueba motora del PGE.

IIb.- La protección motora parcial ejercida por la APO 30 y 60 mM coaplicada con AMPA podría deberse a una difusión más restringida del AMPA en el tejido en presencia de altas concentraciones de APO, más que a una protección por la inhibición de las NOXs.

El trabajo experimental de esta tesis fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (Proyecto PAPIIT IN215610) y CONACYT (Proyecto 128229).

REFERENCIAS

- Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX family of ROS-Generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87, 245-313.
- Boillée S, Cleveland DW. 2008. Revisiting oxidative damage in ALS: microglia, Nox, and mutant SOD1. *J Clin Invest.* 118, 474-478.
- Brennan AM, Suh WS, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA. 2009. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci.* 12, 857-863.
- Chambille I, Rampin O. 2002. AMPA glutamatergic receptor-immunoreactive subunits are expressed in lumbosacral neurons of the spinal cord and neurons of the dorsal root and pelvic ganglia controlling pelvic functions in the rat. *Brain Res.* 933(1), 66-80.
- Cleveland DW, Rothstein JD. 2001. From charcot to lou gehring: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci.* 2, 806-819.
- Corona JC, Tapia R. 2004. AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo. *J Neurochem.* 89, 988-997.
- Corona JC, Tapia R. 2007. Ca²⁺-permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo. *Neuropharmacology.* 52, 1219-1228.
- Corona JC, Tovar-y-Romo LB, Tapia R. 2007. Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 11, 1415-1428.
- Guemez-Gamboa A, Estrada-Sánchez AM, Montiel T, Páramo B, Massieu L, Morán J. 2011. Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate neurotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 70 (11), 1020-1035.
- Harratz MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schöneich C, Engelhardt JF. 2008. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest.* 118, 659-670.
- Kaizawa J, Takahashi I. 1970. Motor cell columns in rat lumbar spinal cord. *Tohoku J exp med.* 101, 25-34.
- Lambeth JD. 2004. Nox enzyme and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 4, 181-189.
- Latarjet M, Ruiz LA. 2004. Anatomía humana. 4ª ed. Médica Panamericana.
- López CP, López MB. 2004. Los miembros del perro: inervación y vascularización. Atlas virtual de la Fac. de Veterinaria, Universidad de Barcelona: http://minnie.uab.es/~veteri/21197/AIVM/atlas_virtual/primer.html

- Marden JJ, Harraz MM, Williams AJ, Nelson K, Luo M, Paulson H, Engelhardt JF. 2007. Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *J Clin Invest.* 117, 2913-2919.
- Matsumoto T, Imagama S, Hirano S, Ohgomorli T, Natori T, Kobayashi K, Muramoto A, Ishiguro N, Kadomatsu K. 2012. CD44 expression in astrocytes and microglia is associated with ALS progression in a mouse model. *Neurosci Lett.* 520(1), 115-120.
- Mennini T, Bigini P, Ravizza T, Vezzani A, Calvaresi N, Tortarolo M, Bendotti C. 2002. Expression of Glutamate Receptor Subtypes in the Spinal Cord of Control and mnd Mice, a Model of Motor Neuron Disorder. *J Neurosci Res.* 70(4), 553-560.
- Molander C, Xu Q, Grant G. 1984. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. *J Comp Neurol.* 230 (1), 133-141.
- Nazli M, Morris R. 2000. Comparison of Localization of the Neurokinin 1 Receptor with AMPA-type Glutamate Receptors in the Rat Spinal Cord. *Anat. Histol Embryol.* 29, 277-281.
- Nicolopoulos-Stournaras S, Iles JF. 1983. Motor Neuron Columns in the Lumbar Spinal Cord of the Rat. *J Comp Neurol.* 217(1), 75-85.
- Pasinelli P, Brown RH. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci.* 7, 710-723.
- Paxinos G. 1985. The rat nervous system. Volume 2. Hindbrain and spinal cord. 1^a ed, Academic press.
- Rothstein J, Martin LJ, Kluncl RW. 1992. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 326, 1464-1468.
- Sorce S, Krause KH, Jaquet V. 2012. Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 69, 2387-2407.
- Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Forestier NL, Marouan A, Dib M, Meininger V. 2001. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci.* 193, 73-78.
- Stefanska J, Pawliczak R. 2008. Apocynin: Molecular Aptitudes. *Mediators Inflamm.* 2008:106507, 10 pag.
- Sutachán JJ, Montoya JV, Ariza J, Baldovino M, Arias M, Robles JD, Hurtado H. 2000. Contribución de fibras mielínicas provenientes de los nervios espinales lumbares L4, L5 y L6 al nervio ciático de rata adulta y sus ramas principales. *IATREIA* 13(4), 215-220.
- Tovar-Y-Romo LB, Santa-Cruz LD, Tapia R. 2009. Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener.* 20, 4-31.
- Tovar-y-Romo LB, Zepeda A, Tapia R. 2007. Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 66, 913-922.

- Trumbull KA, McAllister D, Gandelman MM, Fung WY, Lew T, Brennan L, Lopez N, Morré J, Kalyanaraman B, Beckman JS. 2012. Diapocynin and apocynin administration fails to significantly extend survival in G93A SOD 1 ALS mice. *Neurobiol Dis.* 45(1), 137-144.
- Valdmanis PA, Kabashi E, Dion PA, Rouleau GA. 2007. Knock NOX, who's there? SOD1 mice still are. *Euro J Hum Gen.* 16, 140-142.
- Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G. 2009. *The spinal cord.* 1st ed, Academic Press, Elsevier.
- Weydt P, Hong SY, Kliot M, Moller T. 2003. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport.* 14, 1051–1054.
- Wu DC, Ré DB, Nagai M, Ischiropoulos H, Przedborski S. 2006. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *PNAS.* 103, 12132-12137.