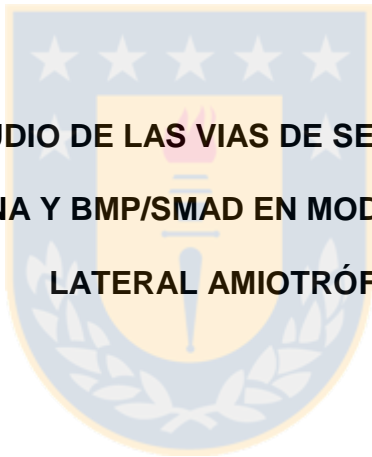




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
-Programa de doctorado en Ciencias Biológicas,
Área Biología Celular y Molecular



**ESTUDIO DE LAS VIAS DE SEÑALIZACIÓN
WNT/ β -CATENINA Y BMP/SMAD EN MODELOS DE ESCLEROSIS
LATERAL AMIOTRÓFICA.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área
Biología Celular y Molecular

CRISTINA ALEJANDRA PINTO FIGUEROA

Enero 2019
CONCEPCIÓN-CHILE

Profesor Guía: Juan Pablo Henríquez Hohmann
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



©2019 Cristina Alejandra Pinto Figueroa.
Se autoriza la reproducción total, o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



1. Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso
Comisión Evaluadora Interna
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

2. Dr. Ariel Castro Alma
Comisión Evaluadora Interna
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

3. Dra. Alejandra Álvarez Rojas
Comisión Evaluadora Externa
Instituto de Química
Pontificia Universidad Católica de Chile



Tesis de Doctorado Financiada por:
Proyecto FONDECYT Regular 1130321 (2013-2016)
Proyecto FONDECYT Regular 1170614 (2017-2020)
Beca de doctorado nacional CONICYT (2012-2016)
Beca Gastos operacionales CONICYT 21120895 (2014-2015)
Beca asistencia a congresos nacionales CONICYT (2013)
Núcleo Milenio en Biología Regenerativa MINREB RC12003 (2014-2016)
Beca apoyo décimo semestre UDEC (2017)
Apoyo asistencia pasantías y cotutelas CONICYT 7057(2015)



A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a mi tutor de tesis Dr. Juan Pablo Henríquez por su compromiso y dedicación en este trabajo.

A los profesores de la comisión Dr. Ariel Castro, Dra. Teresa Caprile y Dra. Alejandra Álvarez por sus comentarios y correcciones.

A todos quienes han sido mis compañeros y amigos de laboratorio: Viviana, Jessica, Jorge, Patricia, Francisca por su enriquecedora contribución al trabajo, por su apoyo y amistad. A la Sra. Aida, por su inmenso cariño.

A los investigadores quienes colaboraron en este trabajo: Dr. Claudio Hetz, Dr., Danilo Medinas, Dr. Agustin Martinez, Dr. Ariel Castro, Dr. Nelson Osses y Dr. Eran Perlson por su fundamental contribución y disposición en la realización de esta investigación.

Al Centro de Microscopía Avanzada CMA, en especial a sus funcionarios Germán, Gustavo, Asia y Nery quien con su excelente voluntad y compañía hicieron afables extensas jornadas de trabajo.

A mis padres Maria Cristina y Ricardo, a mi hermana Annya y mi prima Katita por su incondicional apoyo y amor.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	vi
INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Esclerosis lateral amiotrófica	1
1.1.1 Mecanismos de neurodegeneración en ELA	5
1.1.2 Agregación de proteínas en ELA	7
1.1.3 Vías celulares de degradación proteica involucradas en ELA.	11
1.1.4 Inicio temprano de la patología en neuronas motoras.....	17
1.2 Vía de señalización BMP.....	20
1.2.1 Vía de señalización BMP en neurodegeneración.....	21
1.2.2 Señalización BMP en neuronas motoras.....	22
1.3 Vía de señalización Wnt	25
1.3.1 Vía de señalización Wnt en neurodegeneración	27
1.3.2 β -catenina en neurodegeneración	32
1.3.3 Agregación de β -catenina en neurodegeneración.....	33
1.4 Contribución de otros tipos celulares en ELA.....	36
1.5 Formación y maduración de la unión neuromuscular (UNM).	38
1.5.1 Formación y maduración de la UNM en ELA	42
1.5.2 Vía de señalización Wnt en sinapsis periférica.....	44
2. HIPOTESIS.....	48
3. OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivo General:	50
3.2 Objetivos Específicos:.....	50

4. MATERIALES Y METODOS	51
4.1 Materiales.....	51
4.1.1 Líneas celulares y animales de experimentación.....	51
4.1.2 Plásmidos.....	52
4.1.3 Soluciones de cultivo celular.....	53
4.1.4 Medios de cultivo de bacterias	54
4.1.5 Enzimas.....	54
4.1.6 Reactivos y soluciones ultra puras.....	54
4.1.7 Oligonucleótidos.....	55
4.1.8 Anticuerpos.....	55
4.1.9 Kits comerciales.....	55
4.1.10 Reactivos y soluciones en general.....	58
4.1.11 Materiales en general.....	59
.....	59
4.2. Métodos.....	59
4.2.1 Cultivo Celular.....	59
4.2.2 Tratamientos:	63
4.2.3 Obtención de muestras:.....	63
4.2.4 Ensayo de adhesión:.....	64
4.2.5 RT-PCR.....	65
4.2.6 Transfección.....	67
4.2.7 Ensayo de luciferasa.....	68
4.2.8 Extracción de proteínas.....	69
4.2.9 Cuantificación de proteínas.....	69
4.2.10 Western blot.....	70
4.2.11 Inmunofluorescencia:.....	72
4.2.12 Ensayos de acoplamiento celular:	76
4.2.13 Adquisición de Imágenes.....	77

4.2.14	Análisis de Imágenes.....	77
4.2.15	Estadística.....	78
5.	RESULTADOS	79
5.1	Caracterización de la identidad neuronal en la línea celular NSC34.....	79
5.2	Caracterización de las vías de señalización Wnt/ β -catenina y BMP/Smad en células NSC34hSOD1.....	85
5.2.1	Caracterización de la vía de señalización BMP-Smad en células NSC34hSOD1.....	85
5.2.2	Caracterización de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en células NSC34hSOD1.....	88
5.2.3	β -catenina se distribuye en estructuras tipo agregados en un modelo animal de ELA.....	97
5.2.4	102
5.2.4	β -catenina se distribuye en estructuras tipo agregados en modelo in vitro NSC34hSOD1.....	102
5.3	Caracterización de la naturaleza de las estructuras de β -catenina en el modelo in vitro de ELA.....	108
5.3.1	Estudio de localización de β -catenina junto a agregados proteicos en células NSC34hSOD1.....	108
5.3.2	Estudio de localización de β -catenina respecto a proteínas de unión intercelulares en células NSC34hSOD1.....	125
5.4	Estudio de la función de las estructuras de β -catenina en el modelo in vitro de ELA dado por las células NSC34hSOD1.....	135
5.4.1	La activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina induce el desensamble de las estructuras de β -catenina en el modelo in vitro de ELA.....	137
5.4.2	La activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina induce un rescate en la diferenciación morfológica de células NSC34hSOD1 ^{G93A}	141
5.4.3	La expresión del ligando Wnt2 promueve la diferenciación morfológica en células NSC34hSOD1 ^{G93A}	145
5.5	Estudio de la vía de señalización Wnt en la unión neuromuscular de modelos in vivo de ELA.....	153
5.5.1	Estudio de la localización de β -catenina en la unión neuromuscular de ratones modelo de ELA.....	154
5.5.2	161
5.5.2	Estudio de la localización de β -catenina en fibras musculares aisladas de ratones modelo ELA.....	161

5.5.3 Estudio de las estructuras postsinápticas inducidas por laminina en cultivo primario de células musculares provenientes de ratones modelos ELA.	166
6. Discusión	170
6.1 Caracterización de factores de transcripción en diferenciación de neuronas motoras.	173
6.2 Estudio de la vía de señalización BMP en ELA.	178
6.3 Estudio de la vía de señalización Wnt en ELA.....	181
6.4 β -catenina en estructuras agregadas.	186
6.5 Función de las estructuras de β -catenina.	199
6.6 Análisis de la UNM en modelos de ELA.....	202
7 CONCLUSIONES:	211
8 REFERENCIAS	213



INDICE DE TABLAS

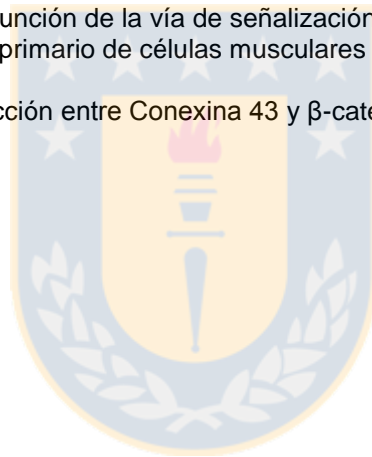
Tabla N°1: Partidores de ADN utilizados para RT-PCR.....	56
Tabla N°2: Listado de anticuerpos primarios utilizados.....	57
Tabla N°3: Listado de anticuerpos secundarios utilizados.....	58
Tabla N°4: Estandarización de cultivos NSC34hSOD1 ^{WT} - NSC34hSOD1G93A.....	61



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Expresión de marcadores de motoneurona en células NSC34hSOD1.....	81
Figura 2: Determinación de la actividad de la vía de señalización BMP/Smad en células NSC34hSOD1.....	89
Figura 3: Expresión de receptores Fdz y Dkk1 en células NSC34hSOD1.....	94
Figura 4. Distribución de β -catenina en motoneuronas de ratones transgénicos hSOD1 ^{G93A}	100
Figura 5. Análisis de distribución de β -catenina en células NSC34hSOD1.....	105
Figura 6. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a agregados de hSOD1 ^{G93A} -GFP en células NSC34.....	110
Figura 7. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a agregados de Ubiquitina en células NSC34hSOD1.....	115
Figura 8. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a γ - tubulina en células NSC34hSOD1.....	117
Figura 8. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a γ - tubulina en células NSC34hSOD1.....	118
Figura 9. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a agregados amiloides en células NSC34hSOD1.....	119
Figura 9. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a agregados amiloides en células NSC34hSOD1.....	120
Figura 10. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a gránulos de estrés en células NSC34hSOD1.....	123
Figura 10. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a gránulos de estrés en células NSC34hSOD1.....	124
Figura 11. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a uniones adherentes en células NSC34hSOD1.....	129
Figura 12. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a conexina 43 y estado funcional de hemicanales en células NSC34hSOD1.....	133
Figura 13. Efecto del tratamiento con LiCl sobre la distribución de β -catenina en células NSC34hSOD1 ^{G93A}	139
Figura 14. Efecto del tratamiento con ANDRO sobre la distribución de β -catenina en células NSC34hSOD1 ^{G93A}	142
Figura 15. Efecto del tratamiento con LiCl sobre la diferenciación morfológica en células NSC34hSOD1.....	146

Figura 16. Efecto del tratamiento con ANDRO sobre la diferenciación morfológica en células NSC34hSOD1.....	149
Figura 17. Efecto de la expresión del ligando Wnt2-HA sobre la diferenciación morfológica en células NSC34hSOD1.....	151
Figura 18. Distribución de β -catenina en la UNM de ratones que expresan hSOD1 ^{G93A}	157
Figura 19. Estudio de la distribución de fosfo- β -catenina-Y654 y fosfo- β -catenina-Y489 en la UNM de ratones que expresan hSOD1 ^{G93A}	158
Figura 20. Distribución de β -catenina en la UNM de ratones que expresan hSOD1 ^{G86R}	160
Figura 21. Estudio de la localización de β -catenina en la región extrasináptica de fibras musculares aisladas de ratones que expresan hSOD1 ^{G93A}	162
Figura 22: Estudio de la localización de β -catenina en la región sináptica de fibras musculares aisladas de ratones que expresan hSOD1 ^{G93A}	164
Figura 23: Estudio de la función de la vía de señalización Wnt en la formación de estructuras postsinápticas en cultivo primario de células musculares modelo de ELA.	168
Figura 24. Posible interacción entre Conexina 43 y β -catenina.....	197



RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas son caracterizadas por la pérdida irreversible de poblaciones neuronales específicas y la continua muerte celular. La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la selectiva degeneración y subsecuente muerte de las neuronas motoras. Esto conduce a una progresiva debilidad, atrofia muscular y parálisis. Se ha descrito que el 10% de los pacientes presentan una relación hereditaria (ELA familiar), de los cuales el 20% de los casos están asociados a mutaciones puntuales en el gen de la enzima Cu/Zn superóxido dismutasa 1. Dentro de estas, la mutación G93A ha sido ampliamente utilizada en la generación de diversos modelos de estudio debido a que replica los principales rasgos clínicos y patológicos presentes en humanos. Aun cuando se han descrito numerosos mecanismos que conducen a la muerte neuronal, los mecanismos que dan origen a la patología no se han encontrado. Por otra parte, ELA continúa siendo una enfermedad para la cual no hay tratamiento descrito, por lo que la búsqueda de los mecanismos moleculares patológicos de características tempranas de la enfermedad es un área de activa investigación.

Se ha determinado que morfógenos del desarrollo, como las familias de ligandos BMP y Wnt, regulan numerosos aspectos del comportamiento neuronal, Más aún, diversos componentes de estas familias se expresan en cerebro adulto y han sido involucrados en neuroprotección. Por ejemplo, se

ha demostrado que la activación de la vía de señalización Wnt se encuentra disminuida en enfermedades neurodegenerativas como en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington. En ELA, se ha descrito la alteración de la expresión de ligandos y receptores de la vía de señalización Wnt en médula espinal y tejido muscular de ratones transgénicos modelo de ELA. De forma importante, se ha descrito la disminución de la activación transcripcional, la alteración de la distribución de β -catenina en estructuras agregadas en un modelo *in vitro* de ELA. Sin embargo, se desconocen los mecanismos de esta disminución en su actividad, del significado de las estructuras de β -catenina y del posible efecto de la activación de vía Wnt. Por otra parte, en modelos de vertebrados, se han reportado cambios en la expresión de componentes de la señalización BMP frente a daño neuronal y regeneración; sin embargo, se desconoce el estado de activación la vía BMP en el contexto de ELA.

Así, se propone como hipótesis general que, **“las vías de señalización de morfógenos del desarrollo se encuentran alteradas en ELA”**. El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar el comportamiento de vías de morfógenos BMP/Smad y Wnt/ β -catenina en modelos *in vitro* e *in vivo* de ELA. Para ello se utilizó un modelo *in vitro* de ELA dado por la línea celular de motoneuronas NSC34, que expresan establemente le enzima superóxido dismutasa humana normal (NSC34hSOD^{WT}) o con la mutación G93A (NSC34hSOD^{G93A}). En ellas, se estudió la localización de β -catenina y se caracterizó la naturaleza de la distribución de β -catenina mediante doble tinciones utilizando marcadores para SOD1, agregados amiloides, uniones

adherentes, uniones comunicantes y proteínas de distintas vías degradativas alteradas en ELA. Posteriormente, a través de tratamientos farmacológicos con activadores de la vía Wnt canónica, como litio y ANDRO, se evaluó la función de la activación de la vía Wnt en un modelo in vitro de ELA, caracterizando cambios en parámetros de diferenciación morfológica. Finalmente para determinar un posible función de la vía Wnt en el desensamble de la sinapsis neuromuscular, se analizó la distribución de β -catenina en la unión neuromuscular de ratones transgénicos que expresan hSOD1^{G93A}. Nuestros resultados muestran la distribución de β -catenina en estructuras de mayor tamaño en células hSOD1^{G93A} que en células control, que pueden ser descensambladas en condiciones de activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, la cual a su vez incrementa la diferenciación neuronal de los progenitores neuronales que expresan hSOD1^{G93A}. Además, se detectaron niveles menores de β -catenina en la unión neuromuscular de ratones transgénicos que expresan hSOD1^{G93A}.

Por otra parte, el análisis de la activación de la vía de señalización BMP/Smad muestran un incremento en la activación de la vía BMP en células NSC34hSOD1^{G93A}. Estos antecedentes sitúan la alteración de las vías de señalización de morfógenos como parte de los mecanismos que pueden participar de la degeneración neuronal en ELA, los que pueden ser una potencial herramienta terapéutica para el tratamiento de la ELA.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are characterized by the irreversible loss of specific neuronal populations and continuous cell death. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the selective degeneration and subsequent death of motor neurons. This leads to progressive weakness, muscle atrophy and paralysis. It has been described that 10% of patients have a hereditary relationship (familial ALS), of which 20% of cases are associated with point mutations in the enzyme gene Cu/Zn superoxide dismutase 1. Within these, the G93A mutation has been widely used in the generation of different study models as it replicates the main clinical and pathological features present in humans. Even though numerous mechanisms have been described that lead to neuronal death, the mechanisms that give rise to the pathology have not been found. As ALS continues to be a disease for which there is no treatment described, the search for pathological molecular mechanisms at early stages of the disease is an area of active research.

It has been determined that morphogens of early development, such as the BMP and Wnt ligand families, regulate numerous aspects of neuronal behavior. Furthermore, various components of these protein families are expressed in the adult brain and have been involved in neuroprotection. For instance, it has been shown that the activation of the Wnt signaling pathway

is diminished in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases. In ALS, it has been described that ligands and receptors of the Wnt signaling pathway display altered expression in the spinal cord and muscle tissue of transgenic mice models of ALS. Importantly, the β catenin dependent transcriptional activation is decreased in an in vitro model of ALS, where β -catenin distributes in aggregated structures. However, the mechanisms involved in Wnt pathway activity decrease, the potential relevance of β -catenin structures, and the possible effects of Wnt pathway activation in the context of ALS are unknown. On the other hand, in vertebrate models, changes have been reported in the expression of components of BMP signaling in the context of neuronal damage and regeneration; however, the activation status of the BMP pathway in the context of ALS is unknown.

Thus, it is proposed as a general hypothesis that, "morphogen-dependent signaling pathways are altered in ALS". The general aim of this thesis was to study the behavior of BMP/Smad and Wnt/ β -catenin pathways in in vitro and in vivo models of ALS. To this end, we used an in vitro model of ALS given by the motor cell line NSC34 stably expressing the human enzyme superoxide dismutase, either the wild-type sequence (NSC34hSODWT), or carrying the G93A mutation (NSC34hSODG93A). In these cells, the distribution of β -catenin was characterized by double staining using markers to identify SOD1, amyloid aggregates, adherent junctions, gap junctions and proteins of different degradative pathways altered in ALS. Later, through pharmacological treatments with activators of the canonical Wnt pathway,

such as lithium and ANDRO, the function of activation of the Wnt pathway was evaluated in an in vitro model of ALS, characterizing changes in parameters of morphological differentiation. Finally, we determined a possible function of the Wnt pathway in the disassembly of the neuromuscular synapse by analysing the distribution of β -catenin in the NMJ of transgenic mice expressing hSOD1G93A. Our results show that β -catenin distributes in larger structures in hSOD1G93A cells than in controls, structures that can be disassembled by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which, in turn, increases neuronal differentiation of neuronal progenitors expressing hSOD1G93A. In addition, lower levels of β -catenin were detected in the neuromuscular junction of transgenic mice expressing hSOD1G93A.

On the other hand, the analysis of the activation of the BMP/Smad signaling pathway shows a significant increase in the activation of the BMP pathway in undifferentiated NSC34hSOD1G93A cells.

Together, this evidence places the alteration of signaling pathways activated by morphogens as part of the mechanisms that can participate in neuronal degeneration in ALS, which can be a potential therapeutic tool for the treatment of the disease.

1. INTRODUCCIÓN

“Enfermedad neurodegenerativa” es un término que agrupa un conjunto heterogéneo de trastornos caracterizados por la progresiva degeneración de ciertas poblaciones neuronales en el sistema nervioso central y periférico, entre ellas la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Los pacientes que presentan enfermedades neurodegenerativas comienzan a desarrollar los síntomas típicamente durante la adultez y no poseen tratamientos efectivos, en gran medida debido a que el o los mecanismos primarios del origen de dichas patologías no han sido descritos. En la medida en que se puedan conocer los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el origen de estas enfermedades, es que será posible acercarse al diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

1.1 Esclerosis lateral amiotrófica

La ELA, descrita por Jean-Martin Charcot en 1869, es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la selectiva muerte de las neuronas motoras superiores, cuyos cuerpos celulares se encuentran presentes en la corteza motora y tallo cerebral, o inferiores, en el asta ventral de la médula espinal (Brujin et al 2004b, Goodall & Morrison 2006, Mancuso & Navarro 2015, Pasinelli & Brown 2006). Lo anterior conduce a debilidad muscular,

progresiva atrofia, parálisis y muerte en un período de uno a cinco años desde el inicio de la enfermedad (Bruijn et al 2004b, Chio et al 2009, Pasinelli & Brown 2006, Wijesekera & Leigh 2009). Los síntomas son evidenciados en la adultez, entre los 55 a 65 años con una media de inicio de 64 años (Wijesekera & Leigh 2009). Estudios de epidemiología en ELA describen una incidencia de entre 1,5 y 2,7 casos nuevos por 100.000 habitantes por año (promedio de 1,89 por 100.000 habitantes / año) y una prevalencia de 2,7 a 7,4 casos por 100.000 habitantes (promedio de 5,2 por 100.000) (Chiò et al 2013, Wijesekera & Leigh 2009). Su etiología es aún desconocida, siendo el 95% de los casos llamados “esporádicos” (ELAe), dado que no presentan un componente genético asociado, sin poder relacionarse a algún factor de riesgo. Sin embargo, se ha descrito que el 5% de los pacientes presentan una relación hereditaria, llamada “familiar” (ELAf) (Byrne et al 2010, Leblond et al 2014, Strong et al 1991). A este respecto, diversas mutaciones han sido involucradas en la etiología de ELAf para numerosas proteínas como alsina, senataxina (SETX), synaptobrevina/VAMP-B, proteína asociada a membrana de vesícula-asociada a proteína B, dinactina, TDP43, FUS, OPT, ANG, TATA15 y EWSR1, HNRNPA1, PFN1, C9ORF72, UBQLN2 entre otras, con un porcentaje estimado del 1 al 5% o, en algunos casos, desconocido (Blokhuys et al 2013, Bruijn et al 2004a, Hayashi et al 2016, Leblond et al 2014, Robberecht & Philips 2013, Schymick et al 2007). Sin embargo, el 20% de los casos familiares están asociados a mutaciones puntuales en el gen de la enzima Cu/Zn superóxido dismutasa 1 (SOD1; (Rosen 1993), una proteína

expresada ubicuamente y predominantemente citosólica. La proteína SOD1 consta de una secuencia de 153 aminoácidos, que funciona como un homodímero. Cada subunidad de SOD1 une un átomo de zinc y un átomo de cobre. A través de la oxidación y reducción cíclica (dismutación) del cobre, SOD1 convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (Bruijn et al 2004b, Pasinelli & Brown 2006). Las distintas mutaciones puntuales en los exones 1, 2, 4 y 5 conducen a la sustitución de un aminoácido alterando distintos dominios de la enzima que muestran cambios funcionales y estructurales muy diversos, encontrándose dispersas en la estructura primaria y tridimensional (Bruijn et al 2004b, Deng et al 1993, Guégan & Przedborski 2003). Es relevante mencionar que en pacientes de ELAf, se han documentado más de 180 mutaciones para SOD1 (Abel et al 2012; <http://alsod.iop.kcl.ac.uk/>), lo que da cuenta de la diversidad de posibles orígenes genéticos de la enfermedad.

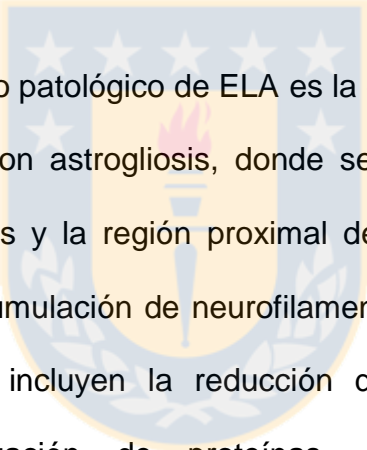
Sin perjuicio de lo anterior, distintas mutaciones de la enzima SOD1 han sido utilizadas para generar diversos modelos de estudio de ELA (Gurney et al 1994). Uno de los primeros modelos in vivo desarrollados para el estudio de ELA fueron ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de SOD1 humano (hSOD1) con la mutación G93A. Este modelo ha sido ampliamente utilizado pues fenocopia en forma consistente los principales rasgos clínicos y patológicos presentes en humanos (Goodall & Morrison 2006). Específicamente, estos animales sufren parálisis en una o más extremidades como consecuencia de la pérdida de las neuronas motoras de la médula

espinal y mueren a los 5 a 6 meses de edad (Gurney et al 1994). *In vitro*, también han sido generados modelos de ELA en numerosas líneas celulares en las que se han descrito diversas características patológicas (Arciello et al 2010, Pasinelli et al 1998). Entre ellas, las células NSC34 han sido ampliamente utilizadas como modelo de motoneuronas, dado que expresan acetil transferasa de colina (ChAT), inducen contracción en co-cultivos con miotubos de ratón, generan potenciales de acción y expresan proteínas de neurofilamentos. Además, estas células sintetizan, almacenan y secretan acetilcolina (ACh) y son capaces de inducir agregación del receptor de acetilcolina (AChR), un marcador de diferenciación postsináptica de la sinapsis neuromuscular, cuando son co-cultivadas con miotubos primarios (Cashman et al 1992, Fukada et al 2004, Gomes et al 2008, Maier et al 2013).

Actualmente, ELA es una enfermedad sin tratamiento. El único fármaco utilizado es Riluzol, el cual que confiere un efecto paliativo y de corta duración, como retrasar el uso de ventilación mecánica y extender la sobrevivencia del paciente 3 a 6 meses (Bensimon et al 1994, Lacomblez et al 1996). Un aspecto interesante de esta enfermedad es que el perfil clínico y patológico de las formas esporádica y familiar de ELA son estrechamente similares, condición que impide distinguir ambas formas a partir del perfil clínico (Bruijn et al 2004b). Considerando lo anterior, y dado que las conclusiones obtenidas en modelos de ELA basados en mutaciones genéticas se pueden aplicar a ELA esporádica (Bruijn et al 2004b, Dadon-Nachum et al 2010, Pasinelli & Brown 2006), una interesante posibilidad es

que la patogénesis de ambas formas de esta enfermedad converja en una vía común y/o compartir factores tóxicos similares. En este sentido, la búsqueda de nuevos mecanismos moleculares en modelos in vitro e in vivo, que den cuenta de vías comunes a la diversidad de orígenes de la enfermedad, y que ofrezcan potenciales blancos terapéuticos, constituye uno de los mayores desafíos en el campo de estudio de esta patología.

1.1.1 Mecanismos de neurodegeneración en ELA



A nivel celular, el sello patológico de ELA es la degeneración y muerte de las neuronas motoras, con astrogliosis, donde se observa un incremento del tamaño de los somas y la región proximal del axón, diversas inclusiones intraneuronales y acumulación de neurofilamentos fosforilados (Munoz et al 1988). Además, se incluyen la reducción de la secreción de factores neurotróficos, agregación de proteínas, disfunción mitocondrial, la interrupción del transporte axonal, alteración en el metabolismo del calcio, cambios en las proteínas de citoesqueleto, altos niveles de glutamato y daño oxidativo (Bruijn et al 2004b).

El conjunto de mecanismos por los cuales las mutaciones para SOD1 causan la muerte neuronal no ha sido completamente descrito. Al respecto, se ha descartado la pérdida de función dismutasa, ya que distintas mutaciones encontradas para SOD1 tienen distintos niveles de actividad (Borchelt et al 1994, Bruijn 1998, Reaume et al 1996, Ripps et al 1995). Así,

más que un alteración en la actividad enzimática, las mutaciones de SOD1 confieren una función tóxica que contribuye a la patogénesis de la ELA familiar (Bruijn et al 2004b).

A pesar de ello, se conoce que las funciones tóxicas que conducen a la degeneración neuronal en ELA involucran un programa de muerte celular (Guégan & Przedborski 2003, Reaume et al 1996, Sathasivam et al 2005, Sathasivam et al 2001). Un evento inicial en la muerte neuronal por apoptosis, es la activación de caspasa 1, evidenciada en ratones transgénicos y en líneas celulares derivadas de células N2a que expresan establemente las mutaciones para hSOD1 G37R, G41D o G85R (Pasinelli et al 1998), seguido temporalmente por la activación de caspasa 3 junto con la aparición de neuronas apoptóticas (Pasinelli et al 2000) y la activación de caspasas 9, 3 y 8 (Sathasivam et al 2005). En contraparte, la expresión de hSOD1^{G93A} en la línea celular neuronal N2a induce, a su vez, la expresión de proteínas antiapoptóticas como BCL2, donde puede ejercer efectos anti y pro apoptóticos (Crosio et al 2006). Para ejercer su efecto anti apoptótico, BCL2 se une a procaspasa-3 e inhibe su activación (Iaccarino et al 2011). Por otra parte, BCL2 interacciona con la hSOD1 mutada tanto *in vitro* como en ratones transgénicos, presentándose en los agregados intracelulares, induciendo la exposición del dominio BH3 de BCL2, transformándola en una proteína pro-apoptótica (Hetz et al 2007, Pasinelli et al 2004, Pedrini et al 2010). Estos hallazgos evidencian que proteínas apoptóticas son reclutadas en respuesta a la expresión de hSOD1 mutada.

Otro posible mecanismo de neurodegeneración, involucra la excesiva acumulación de neurotransmisor glutamato, en la sinapsis. Se ha demostrado en ratones que expresan hSOD1^{G93A} la disminución de la expresión del transportador glial de glutamato GLT1, incrementando la concentración de glutamato en la sinapsis y favoreciendo la excitotoxicidad, lo que induce muerte celular mediante el incremento del estrés oxidativo y la activación de vías dependientes de calcio (Barber & Shaw 2010, van Zundert et al 2012). En base a este mecanismo, el único fármaco que confiere una mayor supervivencia en pacientes con ELA es Riluzol, un inhibidor de la liberación de glutamato desde el componente presináptico (Lacomblez et al 1996) mediante inactivación de canales de sodio dependientes de voltaje (Bellingham 2011).

1.1.2 Agregación de proteínas en ELA

La formación de agregados proteicos es una característica de muchas enfermedades neurodegenerativas incluidas las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington (Wood et al 2003b). En ELA, la presencia de agregados proteicos en neuronas motoras afectadas y en oligodendrocitos en la médula espinal, es la principal característica patológica en ELA. Estas inclusiones también se encuentran presentes en la corteza frontal, temporal, hipocampo y cerebelo de pacientes de ELA (Al-Chalabi et al 2012). Es aún debatido si las inclusiones proteicas representan sólo el evento final de las neuronas en degeneración o si ellas también contribuyen a la progresión de

la enfermedad. En forma adicional, se ha descrito que dichas inclusiones pueden asociarse a distintos componentes citosólicos, entre ellos, componentes del citoesqueleto como neurofilamentos fosforilados y no fosforilados, además de proteínas citosólicas y organelos. Por lo tanto, dichos eventos podrían estar relacionados al origen de la toxicidad (Wood et al 2003b). Los agregados predominantemente encontrados en pacientes con ELAf y ELAe corresponden a agregados ubiquitinados, los que son clasificados como: inclusiones compactas (SLIs), hialinas redondas (RHIs) o similares a cuerpos de Lewy (LBHIs). En contraste, los cuerpos de Bunina, también presentes en ELA, son inclusiones eosinófilas, negativas para ubiquitina (Bendotti et al 2012, Blokhuis et al 2013).

Estudios en distintos modelos son consistentes con los hallazgos de agregados proteicos observados en pacientes de ELA. En modelos de ELAf es común que las proteínas asociadas a la patología sean traducidas a proteínas anormales con una alta probabilidad de agregarse y, a menudo, son componentes de dichas inclusiones. En modelos murinos basados en mutaciones para hSOD1, el inicio de los síntomas se encuentra acompañado por un incremento en la acumulación de formas agregadas insolubles en detergente, provenientes de extractos de médula espinal (Prudencio et al 2010, Wang et al 2002a). Estos agregados se han observado en ratones transgénicos con las mutaciones G93A, G85R y G37R de hSOD1, y humanos con ELA, los cuales incrementan durante la progresión de la enfermedad (Bruijn 1998, Bruijn et al 2004b). De esta manera, en ratones

que expresan hSOD1^{G93A}, se ha determinado la presencia de hSOD1 principalmente en inclusiones hialinas (Watanabe et al 2001), incluso en ELAe, en ausencia de mutaciones para esta proteína (Forsberg et al 2010). *In vitro*, la expresión de más de 20 mutaciones para hSOD1 en células HEK293 induce la formación de agregados insolubles en detergente de SOD1 mutada durante las primeras 24 horas (Prudencio et al 2010). En células NSC34, un modelo *in vitro* de motoneuronas, la expresión de hSOD1^{G93A} forma agregados citosólicos, analizados mediante ensayos de insolubilidad en detergente e inmunofluorescencia. Estos resultados demuestran que los cultivos celulares representan buenos modelos para el estudio de la agregación proteica en ELA (Gomes et al 2010, Onesto et al 2011, Wang et al 2002a).

Los agregados de hSOD1 mutada han sido localizados también en mitocondrias en modelos *in vivo* e *in vitro* (Magrane et al 2009). En estadios presintomáticos de la enfermedad se han descrito cambios en la morfología mitocondrial, como un incremento de índice circunferencial y la disminución del número de las mitocondrias. Estos efectos serían explicados por la expansión del espacio intermembrana (Higgins et al 2003, van Zundert et al 2012), indicando que la agregación de hSOD1 induce la disfunción mitocondrial.

Los agregados proteicos presentes en modelos de ELA no son exclusivos de las mutaciones para hSOD1, si no que también se encuentran presentes en

modelos y pacientes con mutaciones para TDP-43 (Maekawa et al 2009) y FUS (Kiernan et al 2011, Kwiatkowski et al 2009, Polymenidou et al 2012). En condiciones silvestres, ambas proteínas han sido asociadas al corte y empalme de transcritos de proteínas, con una localización predominantemente nuclear (Dormann & Haass 2013, Lagier-Tourenne et al 2010, Morohoshi et al 1996); sin embargo, la expresión de estas proteínas con mutaciones asociadas a ELAf poseen una distribución en inclusiones citoplasmáticas (Blokhuys et al 2013). Por otra parte, se ha descrito que diversas proteínas codificadas por genes mutados asociadas a ELAf, incluyendo mutaciones en HNRNPA1, PFN1, C9ORF72, UBQLN2, OPTN, VCP, FUS y TARDBP están presentes en agregados en una gran proporción de pacientes que no poseen dichas mutaciones, sugiriéndose que modificaciones post-traduccionales aberrantes de proteínas podrían inducir su agregación, indicando un papel más extendido en la patogénesis de ELA (Bendotti et al 2012). Más aun, algunas de estas proteínas se encuentran en agregados en otras enfermedades neurodegenerativas como FTLD, ataxia espinocerebral, EH y EA, indicando un involucramiento más general de estas proteínas en neurodegeneración (Blokhuys et al 2013).

A partir de estos hallazgos, se ha realizado la búsqueda de los mecanismos de agregación de las proteínas involucradas en ELAf. En enfermedades neurodegenerativas se ha descrito la presencia de inclusiones proteicas caracterizadas por la presencia de estructuras secundarias tipo hoja- β , las cuales pueden ser detectadas mediante colorantes como rojo Congo,

Tioflavina-S (Th-S) y Tioflavina-T (Th-T) (Elghetany & Saleem 1988). In vitro, se ha descrito mediante tinción con rojo Congo que las formas insolubles de hSOD1 poseen una estructura tipo amiloide (Furukawa et al 2008). Por otra parte, el análisis en cortes de médula espinal de ratones transgénicos con la mutación hSOD1^{AV4}, muestra la distribución de hSOD1 en estructuras insolubles β -barril; sin embargo, estas estructuras no presentan una tinción positiva a Th-S (Kerman et al 2010). Así, se cree que la agregación citosólica de la proteína hSOD1 mutada es mediada por la exposición de dominios insolubles, pero que no pertenecen a la clasificación de estructuras amiloides (Kerman et al 2010), mientras en médulas espinales de ratones transgénicos que portan mutaciones en TDP-43, las inclusiones de la proteína mutada colocalizan con la tinción de Th-T (Bigio et al 2013), indicando la presencia de agregados amiloides. En su conjunto, estos análisis muestran que las estructuras de las inclusiones presentes en ELA no están aun completamente descritas.

1.1.3 Vías celulares de degradación proteica involucradas en ELA.

En condiciones normales, cuando existe la generación de proteínas mal plegadas y formación de agregados, estas proteínas pueden ser reestablecidas en su conformación normal a través de chaperonas como proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*; Hsps) (Bendotti et al 2012). Sin embargo, de estar alterado este proceso, el sistema de control de calidad de proteínas utiliza principalmente tres estrategias para mantener la

homeostasis proteica. Estos son el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS), la autofagia, para su degradación, y de no ser degradados, ellos pueden ser secuestrados en inclusiones intracelulares (Takalo et al 2013).

Tanto en ELAf como en ELAe, las motoneuronas son incapaces de activar apropiadamente las vías necesarias para la correcta eliminación de proteínas mal plegadas, lo que conduce a una cascada de eventos favorables a la formación de agregados (Hetz & Mollereau 2014). Uno de los sistemas de degradación de proteínas afectados en enfermedades neurodegenerativas, incluido ELA, es el sistema de degradación proteica ubiquitina proteosoma (Bruijn et al 2004b, Cheroni et al 2008). En éste, las proteínas son unidas covalentemente a moléculas de ubiquitina y posteriormente degradadas por el proteosoma 26S (Bendotti et al 2012). En ELA, la mayoría de los agregados son positivos en inmunodetección con anticuerpos que reconocen ubiquitina en las líneas transgénicas, así como algunas inclusiones son también positivas para otras chaperonas como Hsc70, en casos de ELAe (Watanabe et al 2001). *In vitro*, células NSC34 transfectadas de forma transiente con un constructo que expresa hSOD1^{G93A}-EGFP mostraron la formación de agregados citoplasmáticos analizados mediante inmunofluorescencia y ensayos de insolubilidad en detergente (Gomes et al 2010), que además colocalizan con tinciones para ubiquitina. De forma similar, células NSC34 que expresan hSOD1^{G93A} muestran una acumulación de especies oligoméricas de hSOD1^{G93A}, las que incrementan en tratamientos de inhibición del proteosoma con el inhibidor

MG132 y en los cuales, a su vez, incrementan los niveles de ubiquitinación. Se ha descrito además, en este mismo modelo, la disminución de la actividad quimiotripsina del proteosoma. Sin embargo, en células que expresan hSOD1^{WT}, en condiciones basales y bajo tratamiento con MG132, ésta se mantiene soluble (Bendotti et al 2012, Crippa et al 2010, Onesto et al 2011), indicando que la expresión de la forma mutada de hSOD1 induce la disfunción del sistema ubiquina proteosoma.

En estrecha relación al sistema ubiquitina-proteosoma se encuentra el sistema de degradación por autofagia. Este proceso consiste en la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, los cuales se fusionan con lisosomas, para la posterior degradación de los sustratos en ellos, siendo la cadena liviana de la proteína asociada a microtúbulos 1 (LC3-II) el marcador comúnmente utilizado de autofagia. Este sistema remueve proteínas de larga vida, organelos dañados y porciones de citoplasma (Bendotti et al 2012, Cuervo et al 2004, Ghavami et al 2014, Nassif et al 2010). Se ha descrito que la disfunción del UPS induce la activación de autofagia como mecanismo compensatorio (Pandey et al 2007). Por ejemplo, tratamientos con rapamicina, que induce autofagia, han demostrado proteger de la muerte celular inducida por la inhibición del proteosoma en células PC12, evidenciando la relación entre ambos procesos (Korolchuk et al 2010, Pan et al 2008).

En ratones transgénicos que expresan hSOD1^{G93A}, los niveles de LC3-II incrementan en médula espinal durante el transcurso de la enfermedad. Sin

embargo, la formación de autofagosomas incrementa en médula espinal de ratones sólo en estadios tardíos (Li et al 2008a). Esta activación de autofagia se ha asociado a pacientes con ELAf y ELAe, mostrando un incremento de los niveles de proteínas asociadas a autofagia como Beclin-1 y LC3-II (Hetz et al 2009). Por otra parte, el bloqueo de autofagia resulta en un incremento de los agregados de hSOD1^{G93A} *in vitro*. Además, en médula espinal de ratones transgénicos para hSOD1^{G93A} incrementan los niveles de autofagia en neuronas sobrevivientes (Crippa et al 2010). Más aún, ratones transgénicos que sobreexpresan hSOD1^{G93A} bajo tratamientos de restricción calórica han mostrado un incremento en los niveles de autofagia y una disminución de la expresión de hSOD1^{G93A} en médula espinal ventral en estadios en los cuales se inicia clínicamente la enfermedad (Zhang et al 2013). En forma similar, ratones doble mutantes que expresan hSOD1^{G93A} y que no expresan XBP-1, un factor de transcripción asociado a la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), han evidenciado un incremento en niveles de autofagia, la localización de hSOD1 en autofagosomas y un incremento en el aclaramiento de los agregados de esta proteína (Hetz et al 2009), lo que muestra que mecanismos de autofagia contribuyen a eliminar los agregados de hSOD1 mutada.

La compartimentalización de ARNm y componentes de la maquinaria de traducción o de degradación de ARNm es un mecanismo de regulación de la expresión génica en organismos eucariontes (Buchan & Parker 2009). En diversas condiciones de estrés celular, se induce la formación de gránulos

de estrés, estructuras caracterizadas por la agregación de mRNAs asociados con un conjunto de factores de iniciación de la traducción (eIF-4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B, eIF3 y eIF2), la subunidad ribosomal 40S y varias proteínas de unión a RNA como el Antígeno intracelular de las células T (TIA-1) (Anderson & Kedersha 2008). En los gránulos de estrés, los ARNm no son degradados, por lo que se encuentran disponibles para la reiniciación de la traducción una vez que la célula se recupera de la condición de estrés. Se ha descrito en células NSC34 que sobreexpresan TDP-43 en condiciones de estrés oxidativo a través del tratamiento con arsenito de sodio (Kedersha & Anderson 2007), que los agregados de TDP-43 colocalizan con el marcador de gránulos de estrés TIA-1 (Colombrita et al 2009, Liu-Yesucevitz et al 2010). Un modelo basado en otra proteína involucrada en ELA^f es FUS, proteína identificada como una ribonucleoproteína de localización predominantemente nuclear en condiciones fisiológicas (Morohoshi et al 1996). En células HEK293 que expresan diversas mutaciones para FUS en condiciones de estrés oxidativo, se observó una deslocalización nuclear de FUS y su ensamblaje en gránulos de estrés citosólicos, evidenciados por medio de la colocalización con el marcador TIA-1 (Bosco et al 2010a). Ambas proteínas tienen un dominio con motivos de reconocimiento para ARN, lo cual podría contribuir a su localización en estas estructuras (Colombrita et al 2009, Li et al 2013b). Más aún, la expresión de mutaciones para FUS (Baron et al 2013) como para TDP43 en células de neuroblastoma humano BE-M17 (Liu-Yesucevitz et al 2010) incrementan el tamaño y la abundancia de los gránulos de estrés (Baron et al 2013, Liu-Yesucevitz et al

2010), mostrando que la expresión de mutaciones para FUS y TDP-43 tiene un rol en el ensamble de los gránulos de estrés. Esto podría afectar la capacidad de las motoneuronas para responder al estrés. Por ejemplo, la activación de la autofagia con tratamientos con rapamicina, un inductor de autofagia, reduce los gránulos de estrés en células que expresan mutaciones para FUS, y reducen la muerte celular y la fragmentación de neuritas (Ryu et al 2014).

Cuando el nivel de acumulación y agregación proteica excede la capacidad del sistema UPS y la vía de autofagia, las proteínas pueden ser activamente compartimentalizadas para minimizar sus efectos tóxicos (Takalo et al 2013). En este mecanismo, las proteínas son transportadas a lo largo de microtúbulos por un transporte dependiente de dineína (Kopito 2000), formando estructuras cercanas al núcleo llamadas agresomas. Estas estructuras están localizadas en el centro organizador de microtúbulos (MTOC), por lo que son típicamente marcadas con anticuerpos dirigidos contra γ -tubulina. El interior de estas estructuras se compone de proteínas ubiquitinadas, envuelto por la proteína de filamentos intermedios vimentina (Takalo et al 2013).

Por otra parte, se ha establecido que la agregación de hSOD1 mutada es una propiedad de las mutaciones presentadas en ELAf. Se ha descrito que el secuestro de estos agregados en inclusiones ricas en filamentos intermedios ocurre por transporte retrógrado, ya que la inhibición del

proteosoma más el tratamiento con nocodazol en células HEK293 que expresan hSOD1 mutada, inhibe la formación de agregados que colocalizan con vimentina (Johnston et al 2000, Markossian & Kurganov 2004), indicando la posible formación de agregomas. Además de permitir el análisis detallado de la naturaleza de los agregados proteicos presentes en ELA, estas evidencias relevan la intervención de estos procesos como posibles blancos terapéuticos para aliviar la sintomatología de la enfermedad.

1.1.4 Inicio temprano de la patología en neuronas motoras.

A pesar de que los síntomas clínicos en ELA son evidenciados en la vida adulta, se han descrito diversas alteraciones en etapas previas al desarrollo de la enfermedad. Entre estas alteraciones tempranas se ha descrito la hiperexcitabilidad, como característica observada a los pocos días del nacimiento. En rebanadas de cerebro obtenidas desde ratones transgénicos que expresan hSOD1^{G93A}, las neuronas del núcleo hipoglosa, que contiene motoneuronas que inervan los músculos de la lengua, muestran un incremento en la corriente de sodio, un incremento en la transmisión excitatoria y la temprana remodelación del árbol dendrítico, en comparación a ratones control (van Zundert et al 2012, van Zundert et al 2008). Otras características morfológicas evidenciadas en estadios tempranos son la disrupción del aparato de Golgi en neuronas motoras, caracterizada por la formación de fragmentos sin una localización definida en el citoplasma (Mourelatos et al 1996, Pinto et al 2013), la disminución del número de

mitocondrias y la alteración de la morfología mitocondrial (Vinsant et al 2013a, Vinsant et al 2013b). Estas alteraciones en ausencia de síntomas sugieren la activación de procesos compensatorios que se saturan en el tiempo, dando paso a la etapa sintomática.

Se ha descrito en células NSC34 que expresan hSOD1^{G93A}, que la expresión de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), marcador de diferenciación neuronal, muestra una disminución en condiciones de diferenciación respecto a las células control, al igual que la expresión de neurofilamentos, ambas analizadas mediante Western blot (Lee et al 2002). Estos antecedentes se correlacionan con numerosos análisis morfológicos, en los cuales la expresión de hSOD1^{G93A} en células NSC34 disminuye el porcentaje de células que desarrollan procesos (Gomes et al 2008, Lee et al 2002, Magrane et al 2009, Pinto et al 2013), y la longitud de dichos procesos (Magrane et al 2009, Pinto et al 2013). A este respecto, reciente evidencia ha mostrado que células diferenciadas a motoneuronas derivadas de células madres pluripotentes inducidas (iPSCs) obtenidas desde ratones que sobreexpresan hSOD1^{G93A}, expresan marcadores como Hb9 y acetiltransferasa de colina (ChAT); sin embargo, ellas muestran prolongaciones más cortas que las células derivadas de ratones control (Yao et al 2013), así como en modelos de ELA a partir de células madre embrionarias humanas (Isobe et al 2015), o en neuronas motoras derivadas a partir de iPSCs provenientes de pacientes que portan mutaciones para hSOD1 (Chen et al 2014). Estos antecedentes indican que la deficiencia de

la diferenciación a neurona motora podría establecerse como un indicio temprano en el curso de la patología, que puede presentarse como objetivo de futuros enfoques terapéuticos.

Respecto a la posibilidad de estudiar los inicios más tempranos de la enfermedad, se ha determinado que morfógenos del desarrollo, como las familias de ligandos Wnt y BMP, regulan numerosos aspectos claves en el desarrollo y comportamiento neuronal como crecimiento, plasticidad y formación de sinapsis (Benavente et al 2012b, Eaton & Davis 2005, Henríquez et al 2011, Katsuno et al 2011, Osses & Henríquez 2015, Salinas 2012, Salinas 2013). Más aún, diversos componentes de estas familias se expresan en cerebro adulto, sugiriendo una función de esta vía de señalización en el sistema nervioso maduro. Si bien estas funciones son menos descritas, diversos estudios han mostrado que la activación de vías de señalización por estas proteínas inciden en la mantención de las conexiones sinápticas y su plasticidad. Además, en el caso particular de las vías de señalización Wnt, se ha descrito su participación en patologías neurodegenerativas como EA y EP, donde su activación conduce a efectos neuroprotectores (Dickins & Salinas 2013, Inestrosa & Arenas 2010, Marzo et al 2016, Purro et al 2014).

Así, aun cuando los acontecimientos relacionados en la sintomatología de ELA se revelan en etapas tardías de la enfermedad, las mutaciones que las causan son portadas durante toda la vida del individuo. Es por ello que el

conocimiento de los eventos involucrados en etapas tempranas de la enfermedad es relevante para la comprensión de los mecanismos que conducen a la degeneración de las neuronas motoras.

1.2 Vía de señalización BMP.

Los ligandos BMP (proteína morfogenética ósea), son citoquinas pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- β). Aun cuando inicialmente fueron identificados por su capacidad de inducir la formación de hueso en células en cultivo, diversos estudios muestran que estos ligandos cumplen diversas funciones en el sistema nervioso (Osses & Henríquez 2015, Saxena et al 2018). Se han identificado y caracterizado 20 ligandos BMP. Estos ligandos interactúan con un complejo heteromérico de dos receptores transmembrana con actividad serina/tronina quinasa, denominados tipo I (BMPRI) y tipo II (BMPRII), los cuales son expresados diferencialmente en distintos tipos celulares. Una vez formado el complejo, BMPRII fosforila a BMPRI para iniciar la fosforilación de proteínas Smad reguladas por receptor (R-Smad). Ellas pueden ser R-Smad 1, 5 y 8 (Chen et al 2004). Una vez fosforiladas, las proteínas R-Smad forman un complejo con una proteína Smad mediadora (Smad4), para finalmente translocar al núcleo donde median la activación o represión transcripcional de genes, dependiendo del contexto celular (Shi & Massagué 2003).

Sin embargo, la activación de los receptores BMP también transduce señales con efectos biológicos que son independientes de la transcripción génica, regulando procesos celulares como la reorganización del citoesquelero a través de la activación de PI3K, GTPasas pequeñas y la quinasa Lim (LimK1) (Sieber et al 2009).

1.2.1 Vía de señalización BMP en neurodegeneración

Los BMPs han mostrado tener funciones en el desarrollo embrionario del sistema nervioso. Sin embargo, también son expresados en cerebro adulto (Charytoniuk et al 2000a, Chen et al 2003a, Peretto et al 2004). En el tejido neuronal adulto, los BMP regulan varias características del comportamiento celular. Por ejemplo, se ha demostrado que la dendritogénesis, el número de neuritas, la longitud de las neuritas y la ramificación axonal son estimulados o inhibidos por diferentes BMPs en diversos tipos neuronales, que incluyen neuronas simpáticas en cultivo, corticales, hipocampales, del cerebelo y periféricas (Anitha et al 2009, Gratacos et al 2001, Horbinski et al 2002, Iwasaki et al 1999, Lee-Hoeflich et al 2004, Matsuura et al 2007, Yabe et al 2002).

Se ha descrito que los ligandos BMP-2, -4, -6 y -7 incrementan su expresión en un modelo in vivo de injuria cerebral en ratones (Chang et al 2003, Hampton et al 2007, Liu et al 2007). En modelos in vivo de EP, la lesión de

las neuronas dopaminérgicas inducida por la droga 6-hydroxydopamine (6-OHDA), muestra la disminución de la expresión del ligando BMP7 y el incremento de la expresión de BMPRII (Harvey et al 2004). Mas aún, en el mismo modelo, el pre-tratamiento con BMP-7 atenúa la degeneración de neuronas dopaminérgicas y restaura la liberación de dopamina (Harvey et al 2004). Por otra parte, la expresión de una forma dominante negativa de BMPRII en ratones, BMPRIIDN, mostró una reducción en la inmunorreactividad tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra, una disminución de la actividad locomotora (Chou et al 2008), indicando que la deficiencia en la señalización BMP endógena aumenta la vulnerabilidad neuronal a estímulos neurotóxicos (Chou et al 2008).

1.2.2 Señalización BMP en neuronas motoras.

No se ha descrito la función que cumplen las BMPs en neuronas motoras de vertebrados. Algunas evidencias de su posible función en este tipo neuronal provienen de modelos experimentales de lesión. Por ejemplo, el ARNm de BMP-2 se expresa en neuronas motoras después de una lesión por aplastamiento del nervio facial en conejos (Wang et al 2007a). De forma similar, lesiones traumáticas de la médula espinal en rata resultaron en un aumento de BMP-7 y BMP-2 alrededor del sitio de la lesión durante la recuperación (Matsuura et al 2008, Setoguchi et al 2001). En términos funcionales, se ha descrito que la administración de noggin (un antagonista soluble de alta afinidad de BMP-2) en modelos de lesión de médula espinal

resulta en la potenciación de la actividad locomotora y el crecimiento axonal (Matsuura et al 2007). En forma similar, experimentos de transplante de células progenitoras neurales que expresan noggin en médulas espinales de ratón lesionadas resultaron en una recuperación funcional parcial (Setoguchi et al 2004). In vitro, se ha demostrado que BMP-2 inhibe el crecimiento de neuritas de la línea celular NSC-34 (Benavente et al 2012b), efecto que está acompañado de un aumento en la fosforilación de Smad 1/5/8, así como por un aumento en la expresión y actividad del gen reporter de Smad, Id1 (Viñals et al 2004, Ying et al 2003). En conjunto, estos hallazgos revelan que la activación de señalización de BMP actúa como un regulador negativo de la diferenciación de neuronas motoras.

Sin perjuicio de lo anterior, la activación de las vías BMP también puede ejercer funciones positivas en las neuronas motoras (Chou et al 2013, Wang et al 2007a). Por ejemplo, la diferenciación a largo plazo (72h) de células NSC34 es inhibida por un inhibidor de señalización Smad, efecto contrario al tratamiento con BMP-4 (Kelly et al 2013). Este efecto retardado del inhibidor, que se observa sólo a los tres días de diferenciación, sobre la neuritogénesis de células NSC34 sugiere que la señalización BMP podría ser requerida sólo una vez que las proyecciones motoras ya han protruído del soma celular (Kelly et al 2013). Así, la señalización BMP podría jugar efectos duales en neuronas motoras: un papel inhibitorio temprano en la diferenciación morfológica, y más tarde, un rol positivo sobre el crecimiento axonal (Henríquez et al 2011, Osses & Henríquez 2015). En este sentido, BMPRII

aumenta su expresión durante la diferenciación de células NSC34 y se acumula en somas y conos de crecimiento. El tratamiento con BMP-2, que inhibe el crecimiento de neuritas, aumenta la expresión del BMPRII (Benavente et al 2012b). Así, BMP-2 junto con inhibir el crecimiento de neuritas, podría inducir en neuronas motoras la expresión de proteínas clave para su posterior diferenciación. Diversas evidencias sugieren que BMPRII podría ser uno de estos genes, pues favorece la diferenciación y conectividad de las neuronas motoras. Por ejemplo, BMPRII es el receptor BMP expresado más abundantemente en las neuronas motoras espinales de ratón (Wang et al 2007a), las que también expresan BMP-2, BMP-4, noggin, BMPRIA y BMPRIB (Miyagi et al 2012). Así, tanto vías de señalización dependientes de Smad a través de BMPRI, como vías de señalización local mediadas por BMPRII, BMP-2 y BMP-4, que ejerce efectos individuales o combinados, en conjunto con la modulación de la disponibilidad de BMP, podrían ser relevantes para la fisiología de las neuronas motoras así como en su capacidad de ensamblar sinapsis funcionales. En este sentido, en *Drosophila*, el gen *wishful thinking* (*wit*), que codifica para BMPRII, regula positivamente el crecimiento y la función sináptica. Mutaciones en *wit* afectan negativamente el tamaño y ultraestructura de la unión neuromuscular, así como todos los parámetros de transmisión sináptica, posiblemente a través de una vía dependiente de Smad, en neuronas motoras (Aberle et al 2002, Marqués et al 2002).

1.3 Vía de señalización Wnt

Los ligandos Wnt comprenden una familia de glicoproteínas de señalización que participa en múltiples eventos durante la embriogénesis. En mamíferos han sido descritos 19 ligandos Wnt, los cuales para ejercer sus efectos biológicos, señalizan a través de la unión a sus receptores Frizzled (Fzd), miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, de siete dominios transmembrana (Ciani & Salinas 2005, Janda et al 2012). El complejo ligando-receptor Wnt-Fzd activa a Dishevelled (Dvl), proteína citoplasmática a partir de la cual pueden ser activadas al menos tres vías de señalización. La vía canónica depende de la unión de un ligando Wnt un receptor Fzd, y a su correceptor LRP5/6, formando un complejo trimérico (He et al 2004, MacDonald & He 2012) que induce el reclutamiento de la proteína Dishevelled (Dvl), y el desensamble del complejo de destrucción de β -catenina formado por axina, APC (Adenomatous poliposis coli) y la enzima glicógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3- β). En ausencia de ligando, GSK-3 β fosforila a β -catenina para ser degradada por el proteosoma. La unión de ligando induce una acumulación de β -catenina, la cual transloca al núcleo donde junto a los factores de transcripción Tcf/Lef1, induce la expresión de genes específicos (Gordon & Nusse 2006, Logan & Nusse 2004). Dentro de las vías no canónicas descritas, la vía de polaridad celular planar induce cambios en el citoesqueleto a través de GTPasas pequeñas (McEwen & Peifer 2000, Yang & Mlodzik 2015), mientras la vía Wnt-calcio, incrementa los niveles de

calcio intracelular y activa la transcripción de genes blanco (Ciani & Salinas 2005, Salinas & Zou 2008). Además de las vías activadas por la interacción con la proteína Dvl, los receptores Fzd pueden señalizar a través de la activación de la proteína G (Koval & Katanaev 2011, Schulte & Bryja 2007), interactuando con Gai, Gαq, and Gas (Nichols et al 2013). Además, los ligandos Wnt pueden señalizar a través de otros receptores, como Ryk (Lu et al 2004) o Ror2 (Oishi et al 2003).

Las vías Wnt están sujetas a regulación por moléculas extracelulares, las que tienen dos posibles modos de acción; por una parte pueden unir directamente a Wnt, como las formas solubles de los receptores Fzd, Sfrps, o el Factor Inhibidor de Wnts, WIF, actuando como antagonistas de la señalización canónica y no canónica (Ciani & Salinas 2005, Hsieh et al 1999, Kawano & Kypta 2003, Mii & Taira 2011). Por otra parte, las proteínas regulatorias secretadas pueden unirse a los correceptores de Wnt, como por ejemplo, la proteína Dickkopf (Dkk1), que al interactuar con LRP5/6 impide la activación de la vía Wnt/ β -catenina (Ahn et al 2011, Glinka et al 1998, Mao et al 2001). También se ha demostrado que la unión del receptor de R-espondina LGR5, induce la internalización del complejos ligando Wnt/receptor Fzd, incrementando o inhibiendo la activación de la vía, según el tipo celular (Carmon et al 2012, Glinka et al 2011).

1.3.1 Vía de señalización Wnt en neurodegeneración

Muchos ligandos Wnts y receptores Fzd son expresados durante el desarrollo del sistema nervioso y también en el cerebro adulto. Esta vía ha sido implicada en diversos trastornos neurodegenerativos como autismo, esquizofrenia, EA y EP (Galli et al 2014, Inestrosa & Arenas 2010, Moon et al 2004, Purro et al 2014, Salinas 2012, Toledo et al 2008). Además, se ha mostrado que regula la apoptosis, que podría conducir a la muerte celular en el cerebro envejecido y que participa en procesos degenerativos. Por ejemplo, se ha reportado que la transfección de una forma dominante negativa del factor de transcripción TCF en neuronas hipocampales incrementa la apoptosis neuronal, efecto revertido por la co-expresión de TCF silvestre, indicando que la señalización mediada por TCF es protectora y, por lo tanto, que la reducción de los niveles de β -catenina podría incrementar la vulnerabilidad a la apoptosis (Zhang et al 1998).

Se ha descrito en pacientes con EA que presentan mutaciones en presinilina 1, una reducción de la estabilización de β -catenina, potenciando la apoptosis neuronal (Zhang et al 1998). En cultivo de neuronas hipocampales tratadas con péptido β -amiloide, cuya acumulación extracelular es característica de la EA, junto con el incremento de la apoptosis neuronal, incrementa la actividad de GSK3- β , induce la desestabilización de β -catenina citosólica, y reduce la transcripción de genes blanco (Alvarez et al 2004, De Ferrari et al 2003, Garrido et al 2002).

En cerebro de pacientes y ratones modelo de EA incrementa la expresión de Dkk1 (Caricasole et al 2004, Rosi et al 2010), indicando que esta vía de señalización se encuentra disminuida en la enfermedad (De Ferrari & Inestrosa 2000, Garrido et al 2002, Inestrosa & Toledo 2008). En forma importante, tratamientos con litio, un activador de la vía Wnt a través de la inhibición de GSK3- β , o la activación directa con medios condicionados enriquecidos en Wnt3a y la sobreexpresión de Fzd1, revierten los efectos nocivos del A β incrementando la viabilidad celular, disminuyendo marcadores y núcleos apoptóticos y manteniendo la arquitectura celular (Alvarez et al 2004, Chacón et al 2008, De Ferrari et al 2003, Garrido et al 2002). Además, en estas condiciones se observó una disminución de la actividad de A β , un incremento en la estabilidad de β -catenina citosólica y en la transcripción de genes blanco como engrailed-1 (Alvarez et al 2004, Chacón et al 2008, Garrido et al 2002, Inestrosa & Toledo 2008), sugiriendo que el efecto neuroprotector de Wnt3a es mediado a través del receptor Fzd1.

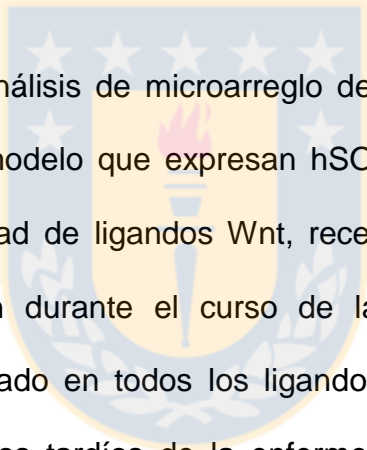
Aun cuando litio se utiliza como un activador de la vía canónica, sus efectos neuroprotectores pueden ser atribuidos a mecanismos adicionales, como por ejemplo, la activación de Akt, y la inhibición del citocromo C (Camins et al 2009, Quiroz et al 2010, Young 2009). Debido a ello, otras drogas se han utilizado en la búsqueda de una activación específica de la vía Wnt. Entre ellas, andrografólido (ANDRO), un diperteno derivado de *Andrographis paniculata* (Basak et al 1999), se ha descrito como un inhibidor de GSK3- β

de características no competitivas con ATP, que por lo que no altera el comportamiento de otras quinasas (Tapia-Rojas et al 2015). También se ha descrito al activador de la vía no canónica FOXY-5, un heptapéptido que imita el efecto del ligando Wnt5a (Säfholm et al 2006) y Wasp-1, descrito como un potenciador de la vía Wnt canónica dependiente de la activación con Wnt3a (Beaumont et al 2007).

En modelos in vivo de EA, la activación de la vía de señalización Wnt incrementa la función cognitiva (Serrano et al 2014, Tapia-Rojas et al 2015, Varela-Nallar et al 2015). Por una parte, en ratones doble transgénicos que expresan mutaciones asociadas a EA familiar (APP^{swe}/PS1^{dE9}), el tratamiento crónico con el potenciador Wasp-1 y FOXY-5 en hipocampo en estadio adulto, incrementa la memoria episódica (Vargas et al 2014). En el mismo modelo, ANDRO tuvo los mismos efectos (Serrano et al 2014, Tapia-Rojas et al 2015, Varela-Nallar et al 2015). Además, tratamientos con ANDRO incrementan el índice de reconocimiento de objetos, la sobrevida y el rendimiento cognitivo (Rivera et al 2016b) en animales envejecidos de la especie *Octodon degus*, un modelo natural de EA esporádica, debido a que desarrolla depósitos de péptido β -amilode e hiperfosforilación de Tau, lo que a su vez se relaciona con activación glial, la expresión de marcadores de estrés oxidativo, disminución de la plasticidad sináptica y memoria espacial (Ardiles et al 2012, Braidy et al 2012, Inestrosa et al 2005, Inestrosa et al 2015, Rivera et al 2016a, Tarragon et al 2013).

La expresión de ligandos Wnts en estadios adultos podría relacionarse también con la mantención sináptica (Purro et al 2014). A este respecto, se ha descrito que en cerebro de pacientes y ratones modelo de EA incrementa la expresión del inhibidor de la vía canónica Dkk1 (Caricasole et al 2004, Rosi et al 2010). En neuronas hipocampales, el tratamiento agudo con Dkk1 disminuye el número y tamaño de agregados de proteínas sinápticas (Purro et al 2012). Así mismo, en ratones transgénicos modelo de EA y rebanadas de hipocampo tratadas con el péptido A β incrementa la expresión de Dkk1 (Purro et al 2012, Rosi et al 2010). En este mismo modelo además, la inhibición mediante anticuerpos para Dkk1 revierte la pérdida de sinapsis, demostrando que su expresión es requerida para este fenómeno (Purro et al 2012). En apoyo a estos antecedentes, se ha descrito que el incremento de la expresión de Dkk1 en hipocampo altera negativamente la plasticidad neuronal, evaluada a través de los procesos de potenciación sináptica a largo plazo (LTP) y depresión sináptica a largo plazo (LTD), a través de un mecanismo que combina la inhibición de GSK3 β y las vías RhoA-Rock (Marzo et al 2016). Por otra parte, en cultivo de neuronas hipocampales, la incubación con Wnt5a o con Foxy-5 induce la acumulación de la proteína de andamiaje postsináptica PSD95. Más aun, Wnt5a previene la disminución de las puntas de PSD95 inducidas por A β (Cerpa et al 2010, Varela-Nallar et al 2012a). De este modo, este ligando Wnt induce un efecto neuroprotector, manteniendo la densidad de contactos sinápticos. A su vez, el tratamiento in vivo con Wasp-1, Foxy 5 y ANDRO en ratones transgénicos APP^{swe}/PS1^{dE9} y el posterior análisis en rebanadas de hipocampo,

mostraron el rescate del daño sináptico, incrementando la transmisión sináptica glutamatérgica y el LTP (Serrano et al 2014, Varela-Nallar et al 2015, Vargas et al 2015). En su conjunto, estos hallazgos revelan que, además de sus funciones en el desarrollo embrionario, un descontrol en la regulación de vía de señalización Wnt en el sistema nervioso adulto se encuentra asociada en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, a la vez que su activación resulta tener efectos neuroprotectores, incrementando la sobrevivencia celular y la mantención de la sinapsis.



En ELA, mediante análisis de microarreglo de ARNm a partir de médula espinal de ratones modelo que expresan hSOD1^{G93A}, se ha determinado que una gran variedad de ligandos Wnt, receptores Fzd y genes blanco alteran su expresión durante el curso de la patología, mostrando un incremento generalizado en todos los ligandos, receptores, e inhibidores analizados en estadios tardíos de la enfermedad (Yu et al 2013). En el mismo modelo, se ha demostrado un incremento en la expresión de ligandos Wnt como Wnt1, Wnt2, Wnt5a y receptores Fzd 1 y 2, localizados en mononeuronas, las que fueron evidenciadas a través de co-tinciones con tubulina betaIII (Li et al 2013a, Wang et al 2013). En células gliales, por otra parte, incrementa la marca nuclear de β -catenina, colocalizando con BrdU y GFAP, indicando la activación de la vía Wnt en células gliales en proliferación (Chen et al 2012).

En un modelo *in vitro*, y en relación con la evidencia previa en modelos de EA, se ha determinado que células NSC34 que expresan establemente hSOD1^{WT} presentan un incremento de la activación transcripcional de la vía Wnt durante la diferenciación a un fenotipo neuronal, medida por ensayos de gen reportero luciferasa. Dicho incremento no se observó en células NSC34hSOD1^{G93A} (Pinto et al 2013), lo que sugiere una inhibición de la activación de la vía Wnt durante la diferenciación de este modelo celular de motoneuronas.

1.3.2 β -catenina en neurodegeneración

Un efector clave para la activación de la vía Wnt es β -catenina. Esta puede estar asociada a diversas funciones. Por una parte, β -catenina forma parte de las uniones adherentes, promoviendo la adhesión celular, debido a su unión al dominio intracelular de proteínas cadherinas, ligándolas al citoesqueleto de actina a través de su función como proteína adaptadora (Bienz 2005). Por otra parte, su función señalizadora es llevada a cabo por una población citoplasmática soluble de β -catenina. Estos antecedentes reflejan la necesidad de un coordinado control entre ambas funciones. Al respecto, se ha descrito que la fosforilación del residuo Y142 de β -catenina induce la disociación desde las uniones celulares, y el cambio hacia la población que participa en la vía Wnt, mostrando localización nuclear mediante inmunofluorescencia (Bienz 2005, Davis et al 2008). Mientras, la fosforilación de β -catenina en Y546 en neuronas hipocampales muestra

colocalización con componentes del citoesqueleto a través de inmunofluorescencia para tubulina β III y actina. Por otra parte, la fosforilación en los residuos S33/37 por GSK3 β son una marca para su degradación en el proteosoma, en ausencia de activación de la vía de señalización Wnt (Liu et al 2002).

En la médula espinal, las neuronas motoras presentan una organización circunscrita e invariable en sub-conjuntos denominados columnas, importantes para el ensamble de circuitos sensoriales/motores, y específicas para los tipos musculares inervados. Se ha descrito que la mutación de cadherinas tipo I y II modifican la organización de los subconjuntos de neuronas motoras en la médula espinal (Price et al 2002) y que la delección de β -catenina y γ -catenina alteran la segregación de las columnas de neuronas motoras (Demireva et al 2011). Por lo tanto, β -catenina presenta funciones no asociadas a la activación transcripcional dependiente de la vía de señalización Wnt durante el desarrollo de las neuronas motoras.

1.3.3 Agregación de β -catenina en neurodegeneración

En enfermedades neurodegenerativas, se ha descrito que β -catenina forma parte de estructuras agregadas. En cerebros de pacientes con EA se han evidenciado agregados citoplasmáticos de fosfo- β -catenina en serina 33/ treonina 41 marcada para ubiquitinación. A su vez, estas formas agregadas

son inducidas en células de neuroblastoma N2a, tratadas con inhibidores del proteosoma, indicando la disfunción del sistema ubiquitina-proteosoma (Ghanevati & Miller 2005). Además, los agregados de β -catenina colocalizan con vimentina y γ -tubulina (Ghanevati & Miller 2005), demostrando su localización en agresomas. Por otra parte, en lisados de cerebro de pacientes post-mortem y ratones modelo de la EH, se ha observado la acumulación de agregados de β -catenina fosforilada para ubiquitinación. Además, en cultivo de neuronas estriatales que expresan huntingtina poliglutaminada, un modelo *in vitro* de EH, se ha observado un incremento en la muerte celular asociado a la presencia de agregados de β -catenina. Más aún, la expresión de un ARN de doble hebra que interfiere la expresión de β -catenina rescata de la muerte neuronal evidenciada en este modelo (Godin et al 2010). Estos antecedentes indican que la agregación de β -catenina como consecuencia de la inhibición de la función del proteosoma, no sólo es una característica común a estas enfermedades, sino que tiene incidencia negativa en la sobrevivencia celular. Respecto a modelos de ELA, el análisis de los niveles proteicos de β -catenina en cultivo de células NSC34hSOD1 durante la diferenciación no mostró cambios (Pinto et al 2013). Por otra parte, el estudio de β -catenina in vivo por medio de inmunocitoquímica en médula espinal de ratones que sobreexpresan hSOD1^{G93A} en etapa sintomática, mostró que la marca de β -catenina decrece en el núcleo respecto a las muestras de animales en etapa no sintomática de la enfermedad (Zhang et al 2006), indicando una alteración de la distribución de β -catenina, situación compartida con otras

enfermedades neurodegenerativas (De Ferrari et al 2003, L'Episcopo et al 2011, Zhang et al 1998).

En ratones transgénicos con la mutación para hSOD1^{G93A}, dosis diarias de litio, un activador de la vía de señalización Wnt (Young 2009), mostraron retrasar el inicio de la enfermedad e incrementar la esperanza de vida. En médula espinal se observó el aclaramiento de los agregados de hSOD1 mutante mediante la activación del procesos de autofagia (Fornai et al 2008). Sin embargo, en un modelo similar, el tratamiento con litio ha mostrado efectos completamente opuestos, con un adelanto del inicio de la enfermedad y reducción de la supervivencia (Chio et al 2010, Pizzasegola et al 2009). En estudios clínicos, el tratamiento con litio tuvo resultados adversos en pacientes con ELA (Chio et al 2010). Sin embargo, litio es un tratamiento inespecífico, pues además de la vía Wnt puede alterar otras vías de transducción de señales. En este sentido, los efectos de la activación de la vía de Wnt mediada por ligando, en modelos de ELA, no han sido descritos.

Así, el eje central de este trabajo de tesis abordará los mecanismos mediante los cuales la vía de señalización Wnt se encuentra deprimida en un modelo in vitro de ELA dado por las líneas celulares NSC34 que expresan la forma nativa (control) y mutada en G93A de hSOD1 (modelo de ELA), a través del estudio del comportamiento de la proteína β -catenina y su posible relación con la dis-homeostasis proteica descrita en modelos

de ELA. Por otra parte, se analizará el posible efecto de la activación de la vía sobre la diferenciación neuronal, como un evento temprano de la patología, la cual puede ser un objeto de intervención terapéutica. Esto permitiría contribuir al conocimiento acerca de los mecanismos patológicos desarrollados en ELA, además de situar a la vía de señalización Wnt como un probable candidato donde enfocar la generación de nuevas estrategias terapéuticas.

1.4 Contribución de otros tipos celulares en ELA

Se ha implicado a ELA como una enfermedad que no es exclusivamente dependiente de las mutaciones en las neuronas motoras, ya que la expresión tejido específica de hSOD1^{G93A} en neuronas motoras e interneuronas, inducida durante el desarrollo embrionario, no produce los mismos rasgos clínicos y patológicos clásicos. De hecho, estos ratones no presentan debilidad muscular. Sin embargo, ellos sí presentan una pérdida parcial de motoneuronas, en las cuales se observó agregación de hSOD1 mutada, que colocaliza con ubiquitina y neurofilamentos (Wang et al 2008b). Más aún, la expresión de hSOD1 mutada restringida a motoneuronas, sólo desarrolla la enfermedad en la vejez (Jaarsma et al 2008). Estos resultados sugieren la participación de otros tipos celulares en la manifestación patológica de ELA.

Al respecto, se ha determinado que los astrocitos se encontrarían favoreciendo la patogénesis de la enfermedad. En este sentido, se ha demostrado en ratones que expresan hSOD1^{G93A} la disminución de la expresión del transportador glial de glutamato GLT1, incrementando la concentración de glutamato en la sinapsis y favoreciendo la excitotoxicidad, lo que induce muerte celular mediante el incremento del estrés oxidativo y la activación de vías dependientes de calcio (Barber & Shaw 2010, van Zundert et al 2010). Además, se ha reportado que los astrocitos liberan exosomas que contiene hSOD1 mutada (Basso et al 2013), favoreciendo la propagación de la toxicidad en neuronas. Por otra parte, la delección de hSOD1 mutada en astrocitos, en ratones transgénicos que expresan hSOD1G85R, retrasa el inicio y prolonga la fase temprana de la enfermedad, sin afectar la fase tardía (Wang et al 2009). En el caso de la mutación hSOD1G37R, su delección no afecta la edad de inicio, aun cuando se observó una lenta progresión de la enfermedad (Yamanaka et al 2008). En forma similar, la ablación o reducción de la expresión de hSOD1 mutada en microglía prolonga el tiempo de vida en ratones trasgénicos (Henkel et al 2009). Así la degeneración de las motoneuronas en ELA se encuentra también influenciada por el comportamiento de células vecinas en el sistema nervioso.

Los mecanismos de muerte neuronal, junto con la contribución de astrocitos y microglía constituyen una visión neurocéntrica de la patología (Kiernan et al 2011, Pansarasa et al 2013) en la cual la debilidad muscular y la parálisis son

una consecuencia de la degeneración de las motoneuronas. Sin embargo, evidencia acumulada en los últimos años ha descrito que cambios patológicos en la sinapsis neuromuscular preceden a la muerte neuronal y a los síntomas clínicos. Por ello, se ha postulado que la degeneración de las neuronas motoras podría comenzar distalmente y progresar hacia el cuerpo celular, involucrando a las células musculares y la sinapsis neuromuscular como sitio primario de la toxicidad de las proteínas mutadas asociadas a ELAf, conformando la hipótesis de la degeneración retrógrada (Dadon-Nachum et al 2010, Dupuis & Loeffler 2009, Musarò 2010, Pansarasa et al 2013). Así, estudios enfocados en el comportamiento de la sinapsis neuromuscular en el contexto de ELA podrían dar nuevas luces respecto a los mecanismos moleculares que gatillan la patología.

1.5 Formación y maduración de la unión neuromuscular (UNM).

La UNM es una sinapsis periférica colinérgica formada por el terminal axónico de una neurona motora y una fibra muscular esquelética. La UNM madura está formada por un terminal presináptico caracterizado por vesículas que contienen el neurotransmisor acetilcolina (ACh) y factores tróficos, en cercanía topológica a la membrana presináptica, formando las zonas activas. La membrana postsináptica de la fibra muscular se invagina formando pliegues en aposición al terminal nervioso, con una alta concentración de receptores de acetilcolina (AChR) en las crestas de los pliegues (Fox & Umemori 2006, Sanes & Lichtman 1999). Durante la

formación del tejido muscular, células mesodérmicas mononucleadas comprometidas con el linaje miogénico migran hacia los sitios periféricos donde se formarán los músculos. En este lugar se dividen y diferencian a mioblastos y posteriormente se fusionan formando miotubos. En estadios tempranos del desarrollo, antes del arribo de las neuronas motoras, se ha descrito la presencia de agregados del AChR y transcripción localizada del mismo (Lin et al 2001, Yang et al 2001). La formación de estos agregados aneurales es dependiente de la expresión del receptor tirosina quinasa específica de músculo MuSK (Arber et al 2002, DeChiara et al 1996, Yang et al 2001) y servirían como una guía para los axones motores (Jing et al 2009). Posteriormente, los axones motores inervan a los músculos en una zona central de la fibra muscular (Burden 2002, Lin et al 2001, Sanes & Lichtman 1999). Distintas señales secretadas por el terminal motor cumplen dos funciones esenciales: por una parte, el neurotransmisor ACh, a través de una vía dependiente de la quinasa Cdk5, desarma los agregados del AChR que no serán inervados (Lin et al 2005, Misgeld et al 2002, Misgeld et al 2005), y, por otra, agrina, un proteoglicán de heparán sulfato sintetizado, transportado y liberado desde los terminales nerviosos (Ma 2000) induce la mantención de los agregados inervados (Gautam et al 1996, Lin et al 2001), refinando el patrón previo de agregación del AChR. Una vez en el espacio sináptico, agrina se une directamente al receptor de lipoproteína de baja densidad Lrp4 (Kim et al 2008, Zhang et al 2008) formando un complejo con MuSK, estimulando su fosforilación (Burden et al 2013, Glass et al 1996, Glass & Yancopoulos 1997, Song & Balice-Gordon 2008). Si bien en la señalización

rio abajo de MuSK participan múltiples proteínas, se ha descrito la participación de GTPasas pequeñas (Henriquez et al 2008, Weston et al 2003, Weston et al 2000) y de la proteína de andamiaje rapsina (Apel et al 1997, Gautam et al 1995, Moransard et al 2003, Zhu 2006). En paralelo, LRP4 induce la diferenciación del terminal presináptico, promoviendo la acumulación de vesículas sinápticas (Yumoto et al 2012).

En estadios post-natales tempranos, cada fibra muscular es inervada por más de un terminal motor, las cuales son posteriormente eliminadas para dar lugar a una sinapsis formada por una colateral de axón motor que contacta a una fibra muscular (Buffelli et al 2004). En paralelo, la UNM sufre diversos cambios morfológicos para dar lugar a una conformación estable y funcionalmente eficiente, que persiste durante la adultez (Patton et al 1997, Shi et al 2012). Entre ellos, la formación de invaginaciones de la membrana postsináptica y la redistribución de los AChRs (Sanes & Lichtman 1999, Sanes & Lichtman 2001). Inicialmente los AChRs se encuentran organizados en una estructura oval uniforme denominada placa. En forma gradual, esta estructura comienza a presentar zonas de baja densidad de AChRs hasta conformar una estructura ramificada denominada pretzel (Balice-Gordon & Lichtman 1993, Gan & Lichtman 1998, Lanuza et al 2002, Marques et al 2000, Sanes & Lichtman 1999). Numerosas proteínas han sido implicadas en la mantención de la UNM madura (Shi et al 2012). De hecho, organizadores sinápticos involucrados en la formación de esta sinapsis son también requeridos para la estabilidad de la UNM adulta. Tal es el caso de agrina, un

organizador esencial de la formación embrionaria de la UNM, y cuya delección condicional en animales adultos produce la dispersión de los agregados de AChR y de los componentes de la lámina basal (Samuel et al 2012). Adicionalmente, se ha descrito que la adquisición de estructuras postsinápticas complejas en la UNM ocurre en forma independiente de agrina (Kummer et al 2004). De hecho, en células musculares in vitro incubadas sobre laminina o fibronectina, se ha observado la formación de agregados complejos del AChR, similares a los observados in vivo, independientes del receptor MuSK (Kummer et al 2004). Estos estudios revelan que componentes de la lámina basal son cruciales para la organización de los AChRs en UNMs maduras. Finalmente, durante la vejez, se altera el contacto de los agregados del AChR con el axón motor, donde el aparato postsináptico puede estar parcial o totalmente denervado. Por otra parte, la estructura de los agregados del AChR cambia a una estructura fragmentada característica. Además, el calibre de los axones motores es más delgado o presentan varicosidades, sumado a la aparición de un patrón de poli-inervación (Jang & Van Remmen 2011, Valdez et al 2010). Sin embargo existen grupos musculares, en su mayoría inervados por neuronas del tallo cerebral, que son resistentes a cambios asociados a la edad (Valdez et al 2012). Así, las manifestaciones del envejecimiento no cursan de manera uniforme en todos los músculos. En el contexto del presente trabajo, es importante destacar que los cambios de la UNM asociados al envejecimiento se encuentran presentes también en patologías que involucran neuronas motoras (Frey et al 2000).

1.5.1 Formación y maduración de la UNM en ELA

Se ha descrito que la conexión entre músculo y neurona motora se pierde en ratones que expresan hSOD1^{G93A} mutada antes de la degeneración de neuronas motoras, incluso antes de la manifestación de los síntomas. En pacientes portadores de una mutación para hSOD1^{G93A} se realizó la estimación estadística del número de unidades motoras, demostrándose una reducción varios meses antes de la observación del fenotipo de debilidad muscular, evento ocurrido también en pacientes sintomáticos con ELA esporádica (Aggarwal & Nicholson 2002). Se ha observado en ratones transgénicos que sobreexpresan hSOD1^{G93A} que la pérdida de neuronas motonas en el asta ventral de la médula espinal ocurre en un tiempo intermedio entre la denervación y el inicio de los síntomas (Dupuis & Loeffler 2009, Fischer et al 2004, Frey et al 2000). Más aun, se ha descrito mediante resonancia magnética nuclear el inicio de la atrofia muscular a las 8 semanas de edad, mientras que la pérdida de neuronas del núcleo hipoglosa comienza a las 10 semanas de edad, modelo en el cual el inicio de los síntomas es a las 12 semanas (Marcuzzo et al 2011). Por otra parte, el análisis morfológico de la UNM de músculo extensor digitorum longus (EDL) proveniente de ratones transgénicos que expresan hSOD1^{G93A}, muestra un incremento del porcentaje de UNMs que presentan fragmentación, denervación parcial, y denervación total (Valdez et al 2012). En su conjunto, estos antecedentes favorecen el concepto de que el mecanismo inicial de la enfermedad ocurre

en regiones periféricas, en la sinapsis neuromuscular, lo que gatilla la denervación y posterior degeneración y muerte de las neuronas motoras.

Además de los cambios morfológicos relacionados a la pérdida de la UNM, se han descrito cambios en la transmisión sináptica neuromuscular. En preparaciones de diafragma de ratones presintomáticos que expresan hSOD1^{G93A} se ha demostrado un incremento en la amplitud, frecuencia de potenciales postsinápticos excitatorios de placa EPPs, además de un incremento en el contenido cuantál (vesículas liberadas en respuesta a un impulso), en comparación con ratones control (Rocha et al 2013). En estadios sintomáticos, sin embargo, no se observan diferencias en estos parámetros (Rocha et al 2013), lo cual podría indicar un adelanto en la maduración de la sinapsis, o bien, una respuesta compensatoria ante una eventual denervación (Rocha et al 2013). Estos resultados indican alteraciones funcionales previas al inicio de los síntomas, lo que apoya funcionalmente la idea de la degeneración retrógrada como gatillante de ELA.

Para determinar si la expresión de hSOD1 mutada en las células musculares contribuye a las alteraciones observadas en la UNM, se han desarrollado modelos de expresión de hSOD1 mutada dirigida a células musculares (Dupuis & Loeffler 2009, Pansarasa et al 2013). El análisis de músculos Soleus y Tibial anterior en estadios adultos en ratones transgénicos que sobre-expresan hSOD1^{G93A} sólo en fibras musculares esqueléticas, mostró

una inducción de atrofia muscular, disminución de la fuerza contráctil, además de un incremento en la transcripción de genes relacionados a la atrofia y acumulación de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, no se observó degeneración neuronal a los 4 meses de edad (Dobrowolny et al 2008, Wong & Martin 2010). Por otra parte, el análisis de la UNM en este modelo mostró que los axones motores presentan varicosidades y numerosas ramificaciones, denervación y aparatos postsinápticos de pequeño tamaño (Wong & Martin 2010). De forma importante, el análisis de médulas espinales de ratones de 1 año de edad, muestran un incremento de muerte neuronal, mediante ensayos de TUNEL (Wong & Martin 2010). Por lo tanto la expresión de hSOD1 mutada exclusivamente en tejido muscular induce alteraciones en la UNM y, a largo plazo, la muerte de las neuronas motoras, posicionando a las células musculares como un tipo celular clave en el inicio de la patología y, a su vez, como un potencial blanco terapéutico.

1.5.2 Vía de señalización Wnt en sinapsis periférica

Las primeras evidencias que sugirieron la participación de la señalización Wnt en la UNM de organismos vertebrados surge desde el estudio de efectores de esta vía como Dvl, APC y β -catenina, que modifican la agregación del receptor de acetilcolina (Luo et al 2002, Wang et al 2003, Zhang et al 2007). Por otra parte, se ha descrito la participación de diversos ligandos Wnt, que pueden tener una actividad pro o anti agregación del AChR (Henriquez et al 2008, Jing et al 2009, Strochlic et al 2012, Wang et al

2008a). Entre ellos, se ha descrito que Wnt3a, expresado por células musculares durante las etapas de formación de la UNM, tiene un rol desagregante de los AChRs. En miotubos tratados con Wnt3a se inhibe la formación de agregados de AChR inducidos por agrina, y los agregados previamente inducidos por agrina son dispersados en presencia de Wnt3a. Este efecto involucra la disminución de la expresión de rapsina y el aumento de β -catenina citosólica, sin modificar la actividad transcripcional dependiente de factores de transcripción TCF/LEF (Wang et al 2008a). Otros trabajos en los cuales se activa la vía canónica usando tratamientos con litio, o BIO, que inhiben a GSK3 β en miotubos en cultivo, muestran un efecto negativo en la agregación del AChR (Henriquez et al 2008, Sharma & Wallace 2003). De forma importante, la sobreexpresión in vivo del ligando Wnt3a en músculo Tibial anterior de ratón de 6 semanas postnatales induce la desorganización del aparato postsináptico, mostrando un alto patrón de disrupción similar a la fragmentación (Wang et al 2008a). Más aun, se ha descrito que fibras musculares denervadas incrementan la expresión de Wnt3a (Kurimoto et al 2015) ambas características previamente observadas en ELA (Frey et al 2000, Valdez et al 2012), indicando una posible función de la activación de la vía de señalización Wnt en la pérdida de la UNM.

Pocos estudios han abordado una posible relación entre ELA y un posible desbalance de la vía de señalización Wnt en la UNM. A este respecto, estudios de expresión en fibras musculares de ratones que expresan hSOD1^{G93A} se ha observado que, respecto a los controles, incrementa la

expresión del receptor Fzd9 en estadios presintomáticos, mientras que disminuye la expresión del receptor Fzd2 (de Oliveira et al 2014), lo que sugiere una posible asociación de la vía de señalización Wnt durante el curso de la enfermedad.

En un modelo murino donde se realizó ablación de β -catenina muscular, se observó un incremento en el tamaño de las estructuras postsinápticas en la UNM. El análisis de la morfología de los terminales presinápticos muestran una alteración del patrón de inervación presináptico, lo que correlacionó con análisis funcionales, donde se ha descrito la disminución de la liberación de neurotransmisor (Li et al 2008b, Wang & Luo 2008). Estos antecedentes indican que β -catenina se encuentra relacionada a una señal retrógrada esencial durante la formación de la UNM. A partir de estos resultados, se puede concluir que la expresión y adecuada localización de β -catenina es requerida para formación y mantención de la UNM (Henriquez & Salinas 2012).

En su conjunto estas observaciones indican que β -catenina puede ser un factor común en el proceso de desagregación del AChR y presentar alteraciones durante el curso en la patología en ELA. Debido a ello, nos hemos propuesto como segundo objetivo de tesis Estudiar la distribución de β -catenina en la UNM de ratones modelo ELA. Esta investigación contribuye al conocimiento de los mecanismos involucrados en la degeneración de la unión neuromuscular en ELA. El estudio de dichos mecanismos podría dar luces sobre potenciales blancos terapéuticos en esta enfermedad, dado que

el daño a la UNM podría ser un aspecto inicial de la degeneración y posterior muerte de las neuronas motoras.



2. HIPOTESIS

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa que cursa con degeneración de neuronas motoras. Se ha demostrado que vías de señalización de morfógenos relevantes en el desarrollo embrionario, ejercen funciones en el sistema nervioso adulto. Específicamente, el estado de activación de la vías de señalización Wnt y BMP se encuentra alterado en patologías neurodegenerativas como EA, EP y EH, alteraciones que, se ha sugerido, determinan el inicio de dichas patologías. En base a estos antecedentes la hipótesis general de esta tesis es:

“Alteraciones de las vías de señalización activadas por los morfógenos del desarrollo Wnt y BMP en estadios tempranos de ELA se relacionan con las manifestaciones celulares de la patología”.

Desde esta hipótesis general se desprenden dos hipótesis de trabajo específicas:

(1) No se ha descrito el estado de activación de vías BMP en modelos celulares o animales de ELA de especies de vertebrados. Se ha descrito que la vía de señalización BMP/Smad se encuentra incrementada en modelos de daño neuronal periférico y su inhibición recupera el crecimiento de axones motores. Así, la primera hipótesis de trabajo de esta tesis es:

“La actividad de la vía de señalización BMP se encuentra incrementada en ELA”.

(2) En modelos in vitro de neuronas motoras de ELA, se ha descrito la disminución de la actividad transcripcional de la vía de señalización Wnt, en correlación a una disminución de la capacidad de diferenciación neuronal . En uno de dichos modelos, el efector de la vía Wnt β -catenina se distribuye en estructuras agregadas. Por otra parte, la vía de señalización Wnt ha sido involucrada en la formación de la unión neuromuscular, donde su desbalance podría contribuir a mecanismos patológicos previos a la muerte neuronal, como el desensamble de esta sinapsis . En base a estos antecedentes, la segunda hipótesis de trabajo de esta tesis es:

“Alteraciones en la distribución de β -catenina en neuronas motoras y en la unión neuromuscular en estadios tempranos de modelos de ELA se relaciona con una disminución en la actividad de la vía Wnt”.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Estudiar el estado de activación de vías de morfógenos BMP/Smad y Wnt/ β -catenina en modelos *in vitro* e *in vivo* de ELA, así como el efecto de la activación de la vía Wnt/ β -catenina sobre la diferenciación neuronal.

3.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar el estado de activación de la vía BMP/Smad en cultivo de células NSC34hSOD1^{WT} y NSC34hSOD1^{G93A}.
- Caracterizar la distribución de la proteína β -catenina y su posible relación con proteínas asociadas a la dis-homeostasis proteica descrita en modelos de ELA.
- Estudiar el efecto de la activación de la vía Wnt en un modelo *in vitro* de ELA sobre la distribución de β -catenina y el proceso de diferenciación neuronal.
- Estudiar la localización de β -catenina en la UNM de ratones modelo ELA

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales.

4.1.1 Líneas celulares y animales de experimentación.

Líneas celulares transfectantes estables NSC34hSOD1^{WT} - NSC34hSOD1^{G93A}: Estas líneas fueron gentilmente donadas por el grupo de la Dra. Julia Costa (Instituto de Biología Experimental y Tecnología, Oeiras, Portugal). Para su obtención, células NSC34, correspondientes a una línea celular híbrida generada por fusión de células de neuroblastoma N18TG2 con células precursoras de médula espinal de ratón enriquecidas en precursores de neuronas motoras, fueron transfectadas con vectores PI-neo que codifican para hSOD1^{WT} y hSOD1^{G93A}, usando el método de fosfato de calcio, las que fueron seleccionadas con geneticina sulfato (Gomes et al 2008).

Estas células en estado indiferenciado proliferan al ser incubadas en medio de crecimiento. En diferenciación a un fenotipo neuronal extienden procesos tipo neuritas (Cashman et al 1992).

Animales de experimentación hSOD1^{G93A}: Ratones C57BL que expresan hSOD1^{WT} y hSOD1^{G93A} fueron originalmente obtenidos desde Jackson Laboratories. Todos los procedimientos de experimentación fueron

aprobados por los Comités de Bioética Animal de las Universidades de Chile (Santiago, Chile) y de Tel Aviv (Tel-Aviv, Israel).

4.1.2 Plásmidos.

Topflash: gen reportero de luciferasa de luciérnaga que responde a la activación transcripcional del factor de transcripción TCF/LEF. Permite evaluar cuantitativamente la activación de la vía Wnt canónica (van de Wetering et al 1997).

pRL-SV40: gen reportero de luciferasa de *Renilla reniformis* bajo el control del promotor SV40, el cual permite la expresión constitutiva de la enzima. Fue utilizado para normalizar la actividad transcripcional de TCF/LEF medida con Topflash.

pId1-luc: contiene un tándem de la secuencia de respuesta a Smad del promotor de Id1, fusionados a la secuencia que codifica para luciferasa.

pRL-SV40: gen reportero de luciferasa de *Renilla reniformis* bajo el control del promotor SV40.

FU-GolginRFP: marcador de aparato de Golgi, fusionado a RFP

Wnt2Ha: vector de expresión que contiene el gen que codifica para la proteína Wnt2 fusionada al epítipo HA bajo el control del promotor CMV

YFP: vector de expresión que contiene el gen que codifica para la proteína fluorescente amarilla bajo el control del promotor CMV

Tomato: vector de expresión que contiene el gen que codifica para la proteína fluorescente roja con una longitud de onda de excitación 554/ emisión 581 Tomato bajo el control del promotor CMV.

4.1.3 Soluciones de cultivo celular.

Medio DMEM (Hyclone): contiene 4,5g/L de D-Glucosa; 4,0mM L-Glutamina y 3,7g/L NaHCO₃. Medio usado para preparar medios de cultivo y transfecciones.

Medio de crecimiento: DMEM suplementado con suero fetal de bovino al 10% (Hyclone); 2mM L-Glutamina (HyClone); 100µg/mL Penicilina y Estreptomicina 100U/mL Estreptomicina (HyClone); G418 0,4mg/ml (Calbiochem).

Medio de diferenciación mioblastos primarios: DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO); suero equino 10% (Hyclone); Glutamax1% (Thermo Fisher); 100µg/mL Penicilina y Estreptomicina 100U/mL Estreptomicina (Hyclone)

Trypsina-EDTA 0,25% (Hyclone): usada para desadherir las células desde la placa de cultivo.

OptiMEM (Gibco): medio utilizado para transfección

Neurobasal (Gibco): medio utilizado para diferenciación celular

BIO-AMFTM (Biological Industries): medio de cultivo utilizado para la mantención de mioblastos primarios.

Tripsina C (Gibco): solución utilizada para desadherir mioblastos primarios desde la placa de cultivo.

Colagenasa Tipo I (Sigma): utilizada para desadherir mioblastos primarios desde la placa de cultivo.

Matrigel (Thermo Fisher): utilizada para adherir mioblastos primarios en placas de cultivo.

4.1.4 Medios de cultivo de bacterias

Caldo LB (MoBio): para el crecimiento de bacterias con plásmidos a purificar

Agar LB (MoBio): para la selección de colonias en placas.

Medio SOC: 2% triptona; 0,5% extracto de levadura; 0,05% NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; pH 7,0; glucosa 20mM para la recuperación de bacterias transformadas

4.1.5 Enzimas.

MMLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs), Taq DNA polimerasa (KAPABiosystems), Go-Taq DNA polimerasa (Promega), DNasa I (Fermentas).

4.1.6 Reactivos y soluciones ultra puras.

Agua de biología molecular (Promega), medio BIO-AMF (Biological Industries), Glutamax (Thermo Fisher), mezcla de inhibidores de proteasas (500µM EDTA, 500µM AEBSF, 1µM E-64, 1µM leupeptina, 1µg/ml Aprotinina; Calbiochem), dNTPs (Omega BioTek), EDTA 25mM (Fermentas), Inhibidor de RNasas (Fermentas), lipofectamina (Invitrogen), estándares de DNA de 100 y 1kb (Fermentas), estándares de proteínas (Fermentas), medio de montaje fluorescente Faramount (DakoCytomation), oligonucleótido Óligo-dT (New England Biolabs), reactivo Plus (Invitrogen), reactivo para cuantificación de proteínas (reactivo de Bradford, BioRad), reactivos para cuantificación de ARN y proteínas Qubit (Invitrogen), TRIzol (Invitrogen), Poli-L-Lisina 0,01% estéril (Sigma), Calsein AM (Thermofisher).

4.1.7 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos usados en esta tesis se indican en la tabla N°1. Las temperaturas de denaturación (T_m) de los partidores fueron calculadas utilizando la herramienta de análisis de oligonucleótidos ofrecida por el servidor IDT:

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>,

disponible para uso libre en internet.

4.1.8 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en esta tesis se indican en las tablas N°3 y N°4.

4.1.9 Kits comerciales.

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega): proporciona los sustratos y tampones para medir la actividad enzimática de luciferasas de luciérnaga y de *Renilla*. Este kit fue utilizado para analizar cuantitativamente la activación de la vía Wnt canónica.

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (PerkinElmer):

Reactivos que revelan por quimioluminiscencia la actividad peroxidasa de rábano conjugada a anticuerpos secundarios en ensayos de Western blot.

Gen		Secuencia	Tm (°C)	Th (°C)	Tamaño producto PCR (bp)
Fz 2	S	TCTTCTCGCAAGAGGAGAC	52,6	55	419
	AS	CAGGTGGAAGTACTGCGAA	52,6		
Fz 4	S	TGGCTTTGTGGTGGCTCC	58.5	64	474
	AS	AGGAACGAGGAAGCCGGC	60.5		
Fz 6	S	GGCAATCGCTGACCATGA	55.6	64	308
	AS	TGGCGGCCTGTGAAGTGC	61.6		
Dkk1	S	GCCAGAGACACTAAACCGACAG	57,5	52	295
	AS	ACAAGGCAATGTAGCACACCTC	57,7		
BMPRII	S	TTTGCAGCCTGTGTGAAGTC	55,9	50	403
	AS	CACAAGCTCGAATCCCTAGC	55,6		
HB9	S	GTACCTGTCTCGACCCAAGC	57,5	50	327
	AS	CCATTGCTGTACGGGAAGTT	55,3		
GAPDH	S	GGAGCCAAACGGGTCATCATCTC	60	55	233
	AS	GAGGGCCATCCACAGTCTTCT	61		

Tabla N°1: Partidores de ADN utilizados para RT-PCR. Lista de partidores utilizados para determinar la expresión de receptores Fzd, BMPRII, HB9 y el control interno GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) de ratón; Tm: temperatura de denaturación; th: temperatura de hibridación utilizada en el PCR; bp: pares de bases. Fuente: Elaboración propia.

Antígeno	Tipo	Especie	Marca	Propósito	Dilución
HB9	Policlonal	Conejo	Abcam	ICQ	40µg/mL
E-Cadherina	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz	ICQ	2,5 µg/mL
Conexin 43	Policlonal	Conejo	Sigma	ICQ	0,1µg/mL
α-HA	Monoclonal	Rata	Santa Cruz	ICQ	0,1µg/mL
α-Tubulina	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz	ICQ	0,1µg/mL
Ubiquitina	Policlonal	Conejo	Santa Cruz	ICQ	0,1µg/mL
β-catenina	Policlonal	Conejo	Millipore	WB ICQ	0,1µg/mL
S100	Policlonal	Conejo	DAKO	ICQ	20µg/mL
Acetiltransferasa de colina	Policlonal	Cabra	Millipore	ICQ	25µg/mL
β-catenina	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz	ICQ	0,13µg/mL
α-Tubulina	Monoclonal	Ratón	Sigma	WB	0,76 ug/ml
N-Cadherina	Policlonal	Conejo	Santa Cruz	ICQ	2,5 µg/mL
LC3	Policlonal	Conejo	Santa Cruz	ICQ	2,5 µg/mL
MAP-1B	Policlonal	Cabra	Santa Cruz	ICQ	4µg/mL

Tabla N°2: Listado de anticuerpos primarios utilizados. Se utilizó la dilución indicada para las distintas técnicas. ICQ: inmunocitoquímica; WB: Western blot. Fuente: Elaboración propia.

Antígeno	Marca	Señal	Propósito	Dilución
BTX	Sigma	Rodamina	IHQ	2 µg/mL
BTX	Molecular Probes	547	IHQ	2 µg/mL
IgG Conejo	JacksonImmunoResearch	Cy5	ICQ	5µg/mL
IgG Conejo	JacksonImmunoResearch	Cy2	ICQ	5µg/mL
IgG conejo	JacksonImmunoResearch	Cy3	ICQ	5µg/mL
IgG ratón	JacksonImmunoResearch	Cy3	ICQ	5µg/mL
IgG ratón	JacksonImmunoResearch	Cy2	ICQ	5µg/mL
IgG ratón	JacksonImmunoResearch	HRP	WB	0,4µg/mL
IgG rata	JacksonImmunoResearch	Cy3	ICQ	5µg/mL
IgG Cabra	JacksonImmunoResearch	Cy5	ICQ	5µg/mL
IgG cabra	Invitrogen	Alexa Fluor 488	ICQ	4µg/mL

Tabla N°3: Listado de anticuerpos secundarios utilizados. IgG: inmunoglobulina G; HRP: peroxidasa de rábano, ICQ: inmunocitoquímica; WB: Western blot. Fuente: Elaboración propia.

4.1.10 Reactivos y soluciones en general.

Agarosa (Lonza), Persulfato de Amonio al 10% (PSA, Amresco), bromuro de etidio (10mg/mL, Sigma), DMSO (Sigma), Etanol (Merck), HCl (10M, Merck), isopropanol (Merck), nitrógeno líquido, paraformaldehído (PFA 4% p/v; Sigma), tampón KH (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,6 mM MgCl₂, 1,6 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, pH 7,4) PBS 1X (136mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄; pH 7,4), Rojo ponceau S (0,1%p/v rojo

ponceau S, 5%v/v ácido acético; Sigma), solución de acrilamida 30% (29%p/v acrilamida, 1%p/v bisacrilamida, Sigma), TAE 1X (40mM Tris-acetato; 100mM EDTA; pH 8,0), tampón de electroforesis de proteínas (25mM Tris-base; 250mM Glicina; 0,1%p/v SDS; pH 8,3), tampón de carga proteínas 1X (50mM Tris-HCl pH 6,8; 5%p/v β -mercaptoetanol; 2%p/v SDS; 10%v/v Glicerol; 0,1%p/v azul de bromofenol), tampón de transferencia de proteínas (48mM Tris; 39mM Glicina; 0,037%p/v SDS; 20%v/v Metanol), tampón Tris-fostato BSA 1% (20,7mM Tris; 72,3mM NaCl; 1%p/v BSA), TBS-Tween-20 (72,3mM NaCl; 20,7mM Tris; 0,1% v/v Tween 20), TEMED (Sigma) BSA (Rockland), Gelatina (Sigma), Tween - 20 (USBiological), Tritón X-100 (USBiological).

4.1.11 Materiales en general.

Películas fotográficas (Pierce), papel filtro Whatman, Nitrocelulosa (Bio-Rad), cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro, portaobjetos 24x50mm, placas de multipocillo (24 pocillos de 1,7 mm de diámetro), placas de cultivo celular de 35, 60 y 100 mm de diámetro, pipetas estériles (Axygen), filtros con tamaño de poro de 0,2 μ m (Merck).

4.2. Métodos

4.2.1 Cultivo Celular

Las líneas celulares utilizadas durante el desarrollo de esta tesis fueron mantenidas en una incubadora Thermo Hepa Class 100 a 37°C de temperatura y 5% de CO₂. Los cambios de medio y siembra celular se

realizaron en una cámara de flujo laminar (Nuaire). La morfología celular y de confluencia se monitoreó periódicamente usando un microscopio invertido (Olympus CK40). Para determinar la concentración celular, se agregó una alícuota de células en suspensión en una cámara de Neubauer, la cual posee 5 cuadrantes que soportan un volumen de 0,1µL cada uno. Utilizando un aumento de 10X en microscopio de contraste de fases se contó el número de células/mL de suspensión multiplicando el valor anterior por un factor de 10.000.

4.2.1.1 Células NSC34, NSC34hSOD1^{wt} - NSC34hSOD1^{G93A}.

Las células NSC34 se mantuvieron en medio de crecimiento en placas de cultivo de 100 mm de diámetro, procurando conservar una confluencia celular no mayor al 70%. Cada 2 o 3 días se incubaron las células con tripsina/EDTA 0,025% diluida en PBS por 3 min a 37°C para desadherirlas de la placa, contarlas y transferirlas a una nueva placa. Para realizar los distintos experimentos, el número de células a sembrar según el área de la placa a utilizar se muestra en la Tabla N° 4, además las placas y cubreobjetos de vidrios (previamente sumergidos en etanol 96 %v/v y flameados), deben ser tratados previamente con Poli-L-lisina (PM 150,000-300,000, 0.01%, Sigma) por 24 hr a 37°C, posteriormente lavados con agua destilada estéril e incubados con Gelatina (Sigma) 0,5% por 30 min a 37°C. Una vez sembradas fueron incubadas durante 48 hrs antes de la realización de los experimentos.

Para gatillar la diferenciación, estas células son deplecionadas de suero lavando 3 veces con DMEM y posteriormente incubadas en medio Neurobasal. En el caso de los experimentos de transfección, las células fueron sembradas en medio de crecimiento. Al día siguiente, se procedió con la transfección y al día subsiguiente a la diferenciación.

Placa	Número de Células			
	Inmunocitoquímico	ARN,	Transfección	Mantención
MW2	40.000			
P35	120.000	250.000	500.000	
P60				600.000
P100				1.200.000

Tabla N°4: Estandarización de cultivos NSC34hSOD1^{WT} -

NSC34hSOD1G93A. : Número de células sembradas según el tipo de placa y propósito, para ser diferenciadas. Fuente: Elaboración propia.

4.2.1.2 Cultivo de mioblastos primarios.

Extracción de fibras: Músculos gastrocnemios provenientes de ratones hSOD1^{G93A} y control, fueron diseccionados e incubados en 2ml de DMEM con 2,5% penicilina/streptomina, durante 3h a 37°C. Posteriormente, se incuban en 15ml de DMEM 2,5% p/s durante 30 min a 37°C. Luego, los músculos son disgregados mecánicamente con pipeta Pasteur cebadas con BSA 5%.

Previo a la incubación de las fibras, las placas destinadas a este propósito deben ser tratadas con una solución de BSA 5%, o con matrigel 0,1%

durante 30 min a 37°C, para luego añadir medio de cultivo BIOAMF. Una vez obtenidas las fibras musculares de manera individual, éstas son colectadas y depositadas en placas con DMEM 2,5% p/s previamente incubadas con BSA 5%. Posteriormente se realiza una segunda selección de fibras, las cuales son incubadas en placas con medio BIOAMF, previamente tratadas con matrigel.

Tripsinización: una vez alcanzado un 80% de confluencia, las células son lavadas 1 vez con PBS 1X y desadheridas por incubación con Tripsina C por 15 min a 37°C. La reacción es detenida con un volumen adecuado de medio BIOAMF. Posteriormente las células son pre-plaqueadas en placas sin tratamiento de durante 40 min, donde se adherirán fibroblastos. Finalmente las células no adheridas corresponden a mioblastos, los que serán sembrados en placas tratadas con matrigel e incubadas en medio BIOAMF.

Diferenciación: Una vez que los mioblastos alcanzan un 90% de confluencia, son lavados una vez con PBS1X y son incubados en DMEM 2,5% p/s, 1% Glutamax, 10% SFB, 5% HS. La diferenciación es realizada durante 5 días.

4.2.1.3 Cultivos de miotubos sobre matriz de laminina:

Los mioblastos primarios se sembraron sobre cubreobjetos en placa de 24 pocillos. Un día previo a la siembra, los cubreobjetos en la placa de 24 pocillos fueron tratados con 5 ug/mL de poliornitina e incubados por 30 min a temperatura ambiente dentro de la cámara de flujo laminar. Posteriormente, la poliornitina fue retirada de los cubreobjetos y se dejan secar. Luego, los

cubreobjetos fueron incubados en una solución que contiene 10ug/mL de laminina en medio L-15 suplementado con 0,2% de NaHCO₃. Posteriormente, los cubreobjetos fueron incubados durante toda la noche a 37°C en estufa de cultivo. La solución fue removida y reemplazada por medio de cultivo en el momento de la siembra.

4.2.2 Tratamientos:

Con la finalidad de activar la vía de señalización Wnt, las células NSC34hSOD1 fueron incubadas con LiCl en tratamientos agudos de 40 mM durante 6h a 37°C y tratamientos crónicos con 100 µM durante 24h en medio de crecimiento o de diferenciación (Alvarez et al 2004, De Ferrari et al 2003). Para determinar si los efectos a estos tratamientos están relacionados a la activación de la vía Wnt, adicionalmente se utilizó la droga ANDRO, un inhibidor competitivo de la enzima GSK3β (Tapia-Rojas et al 2015). Las células fueron incubadas con ANDRO 10 µM durante 6h a 37°C en tratamiento agudo, o con ANDRO 2 µM por 24h, para el tratamiento crónico.

4.2.3 Obtención de muestras:

4.2.3.1 Tejido muscular:

Los ratones fueron sometidos a eutanasia en una cámara de CO₂, y posterior dislocación cervical. Los músculos diafragma, Extensor digitorum longus (EDL), Levator auris longus (LAL) y Gastrocnemio fueron obtenidos a partir de animales de 60, 90 y 120 días postnatal.

4.2.3.2 Médula espinal:

Para la obtención de médula espinal, los animales fueron perfundidos con solución salina fría y posteriormente con PFA4%. Las médulas fueron obtenidas por laminectomía y post-fijadas en PFA 4% por 24h, cambiando a PBS 1X con Azida de Sodio 0,1% para almacenaje. Antes de la realización de cortes, fueron realizados gradientes de sacarosa 7,5% por 2h a temperatura ambiente, 15% por 2h a temperatura ambiente y finalmente 30% por 16h a 4°C, preservando la muestra en sacarosa 30%, azida al 0,1%. Los cortes de 25 µm de espesor fueron realizados en criostato, a partir del segmento lumbar L5. Los cortes son posteriormente preservados en PBS 1X con Azida de sodio 0,1% en placas de 48 pocillos.

4.2.4 Ensayo de adhesión:

4.2.4.1 Realización Monocapa:

En cubreobjetos de 12mm fueron sembradas células NSC34hSOD1 a una densidad de 42.000 cels/cm², las que fueron cultivadas durante 4 días hasta formar una monocapa. El medio fue reemplazado cada 24h.

4.2.4.2 Tinción de células:

En paralelo a la formación de las monocapas, se siembran sobre plástico células NSC34hSOD1 en placas de 60 mm las que fueron incubadas hasta alcanzar un 80% de confluencia. Para la tinción fue utilizado el colorante vital Calsein AM mediante incubación por 20 min a 37°C en tampón KH (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 1.6 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, pH 7.4)

suplementado con CaCl_2 0,5 mM, glucosa 5mM o lactato 10mM, y calsein AM 5 μM . Posteriormente, las células fueron tripsinizadas y sembradas sobre la monocapa, en una densidad 105.000 cels/cm². Finalmente, las células fueron fijadas con PFA 4% a los 30 min, 1h, y 2h de incubación a 37°C.

4.2.5 RT-PCR.

4.2.5.1 Extracción de RNA total.

La extracción de RNA desde cultivos celulares se realizó utilizando TRIzol, reactivo que optimiza el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski & Sacchi 1987), basado en la extracción por tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo. Durante la homogeneización de la muestra, el reactivo lisa las células y degrada sus componentes, manteniendo la integridad del RNA. Los cultivos celulares en una placa de 35mm de diámetro fueron homogeneizados con 300 μL de TRIzol usando micropipeta. Se agregó 200 μL de cloroformo por cada 1000 μL de homogeneizado, ya sea de células en cultivo o tejido, y se agitó por inversión. La mezcla fue centrifugada a 12.000xg por 15min a 4°C, obteniéndose una fase orgánica (inferior) que contiene las proteínas, una interfase que contiene el DNA y una fase acuosa (superior) que contiene el RNA. La fase acuosa fue cuidadosamente aspirada y se le agregó un volumen equivalente de isopropanol. Esta mezcla fue incubada toda la noche a -20°C para precipitar el RNA. Después de una centrifugación a 12.000xg por 15min a 4°C, el sedimento fue lavado con etanol al 70% y resuspendido en 15 a 20 μL de agua libre de RNasas. El RNA total obtenido fue denaturado incubando

10min a 65°C y posteriormente en hielo por 10min. La cuantificación fue realizada por espectrofotometría, midiendo la absorbancia (Abs) a una longitud de onda de 260nm. La pureza del RNA se evaluó midiendo la Abs a una longitud de onda de 280nm y se calculó la relación Abs_{260}/Abs_{280} , la que fluctuó entre 1.6 y 2.0. También se utilizó fluorimetría, en Fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen). La reacción se realiza mezclando buffer y reactivo Qubit para ARN (1 y 200 μ l) con un volumen de muestra, la que se incubó por 2 min a temperatura ambiente antes de leer.

4.2.5.2 Reacción de transcripción reversa.

Para eliminar posible DNA contaminante, una cantidad de 1 μ g de RNA total fue sometido a digestión con 1 U de DNasa I por 2 h a 37°C en tampón 10mM Tris-HCl pH 7,5; 2,5mM MgCl₂; 0,1mM CaCl₂. La reacción fue detenida con EDTA 25mM y denaturación enzimática a 65°C por 15min. Para la síntesis de cDNA a partir de RNA total digerido con DNasa I, éste fue incubado con Oligo-dT 10 μ M 70 °C por 10 min y posteriormente con una mezcla de 1 mM dNTPs; 20U de inhibidor de RNasas y un tampón de transcripción reversa (0,5M Tris-HCl pH 8,3; 0,75M KCl; 0,03M MgCl₂), incubados 5 min a 37°C, y finalmente se adicionan 50 U de transcriptasa reversa del virus de leucemia murina (MuLV) a 42°C por 60 minutos. Paralelamente, se realizaron mezclas carentes de transcriptasa reversa en iguales condiciones de reacción para controlar la presencia de DNA genómico contaminante.

4.2.5.3 PCR usando Taq polimerasa.

Para analizar la expresión de genes Fzd por RT-PCR, se amplificó una secuencia del DNA de interés utilizando la enzima DNA polimerasa termoestable Taq polimerasa. Se mezcló 1µl de cDNA a un volumen final de 12,5 µl con: 0,25 U de Taq polimerasa, tampón de Taq polimerasa (MgCl₂ 1,5mM, Tris 20 mM, KCl 50mM, pH 8,5); dNTPs 0,2mM, 0,4 µM de partidor sentido; 0,4 µM de partidor antisentido. La mezcla de PCR fue incubada por 5 min a 95°C en termociclador (Eppendorf) para lograr una denaturación inicial. Luego, las muestras fueron sometidas a 35 ciclos sucesivos de 95°C por 30s para la denaturación, 30s con la temperatura de hibridación de los partidores (Tabla N°1) y 72°C por 30s para la elongación del DNA. Finalmente, se incluyó un paso terminal de elongación a 72°C por 5min. Para comparar intensidades de expresión relativa, se realizó reacciones de PCR en condiciones semejantes, tales como cantidad de reactivos y programa de ciclos, tiempos y temperaturas fueron similares para las dos muestras a comparar. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% que contenían bromuro de etidio 2,5µg/mL y visualizados exponiendo el gel a la luz UV. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo al menos tres veces.

4.2.6 Transfección

Para la sobreexpresión transiente de proteínas en células eucarióticas, el ADN plasmidial que codifica para ellas fue introducido por transfección, utilizando una mezcla de lipofectamina/Plus.

La lipofectamina es un reactivo de transfección compuesto por un lípido policationico y un fosfolípido neutro. Este reactivo presenta una alta eficiencia relativa de transfección en una amplia variedad de células eucariontes. El reactivo Plus aumenta la eficiencia de transfección mediada por lipofectamina, pre-acomplejando las moléculas de ADN. Las células fueron lavadas 3 veces con medio libre de suero (DMEM) e incubadas en OptiMEM. Para cada placa de 35 mm, se mezcló en un tubo un total de 1,5 µg de DNA(s) con 4 µL de reactivo Plus en 125 µL de medio OptiMEM y se incubó a temperatura ambiente por 15min. En otro tubo, se diluyó 5 µL de lipofectamina en 125 µL de medio OptiMEM y se agregó gota a gota sobre el tubo con ADN/Plus. Después de incubar por 15 min a temperatura ambiente, la mezcla ADN/Plus/lipofectamina fue agregada gota a gota sobre las células en 250 µL de medio libre de suero. Las células se incubaron por 4h a 37°C y luego se adicionó medio de cultivo con suero fetal de bovino para alcanzar una concentración final de 10%.

4.2.7 Ensayo de luciferasa.

Con el objetivo de evaluar cuantitativamente la activación de la vía Wnt canónica, se midió la actividad luciferasa reportada por el vector Topflash. Para extraer las enzimas luciferasa de luciérnaga y de Renilla desde las células transfectadas con Topflash y pRL-SV40, éstas fueron lisadas con tampón de lisis pasiva que permite un efecto rápido en la placa de cultivo celular. Debido a que cada enzima luciferasa tiene su sustrato específico, es posible medir la actividad de cada enzima en la misma muestra. Un

volumen de 40µL de lisado fueron transferidos a una placa de 96 pocillos y se les agregó 10µL de sustrato para luciferasa de luciérnaga, la cual indica la actividad transcripcional asociada a pld1-luc. Las mediciones de la reacción quimioluminiscente se realizaron en un luminómetro (Victor 3, Perkin-Elmer), el cual registró los valores de intensidad. Posteriormente, se agregó un reactivo que apaga la señal de luciérnaga y provee el sustrato para luciferasa de Renilla, la cual indica actividad transcripcional codificada por el plásmido pRL-SV40. Se midió la intensidad de quimioluminiscencia nuevamente y se registraron los valores de intensidad. Los datos fueron exportados al programa Excel y se normalizaron como actividad luciferasa de luciérnaga versus actividad luciferasa de Renilla.

4.2.8 Extracción de proteínas.

Se extrajo proteínas totales desde células crecidas en placas de 35mm de diámetro. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS, luego se agregó 82 µL de una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; NaCl 100 mM, Triton X-100 0.5 % v/v sacarosa 0,3M que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas. Posteriormente, se raspó las células con rastrillo. El homogenizado fue centrifugado a 12.000xg por 5 min a 4°C. El sobrenadante obtenido corresponde al extracto de proteínas totales.

4.2.9 Cuantificación de proteínas

La cuantificación fue realizada por fluorimetría, en Fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen). Por medio de la unión selectiva de fluoróforo a las proteínas de

la muestra. La reacción se realiza mezclando buffer y reactivo Qubit para proteínas (1 y 200 µl) con un volumen de muestra.

4.2.10 Western blot.

4.2.10.1 Electroforesis de proteínas.

Para separar las proteínas de cada muestra, entre 5 y 15µg de proteínas totales fueron diluidas en tampón de carga y denaturadas a 95°C por 10 min. Estas muestras, más una mezcla de marcadores de tamaño molecular se sembraron en distintos carriles de geles de acrilamida/bisacrilamida compuesto por un gel separador al 10% (acrilamida/bisacrilamida al 10%p/v; 375mM Tris-base pH 6,8; 0,1%p/v SDS; 0,1%p/v PSA y 0,04%v/v TEMED) de proteínas en la parte superior. La electroforesis se realizó en una cámara con tampón de electroforesis aplicando un voltaje de 140V.

4.2.10.2 Transferencia a membrana Nitrocelulosa

Las proteínas separadas por electroforesis en gel poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de Nitrocelulosa. Para la transferencia, se superpuso el gel sobre la membrana de nitrocelulosa entre dos trozos de papel filtro, los cuales fueron fijados a una abrazadera y se introdujeron dentro de una cámara que con tampón de transferencia. Para permitir el traspaso de las proteínas desde el gel a la membrana, se aplicó una corriente eléctrica constante de 350mA por 90 min a través de la solución.

4.2.10.3 Bloqueo, incubación de anticuerpos y revelado.

La membrana transferida fue bloqueada con tampón TBS pH 7,4 con 0,1% Tween-20 y 5% leche descremada por 1h con agitación y posteriormente fue incubada con anticuerpo primario (Tabla N°3) diluido en tampón de bloqueo por 16h a 4°C. Después de 4 lavados por 10 min cada uno con tampón TBS pH 7,4; 0,1% Tween-20, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (Tabla N°4) diluido en tampón de bloqueo por 2h a temperatura ambiente. La actividad de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) conjugada al anticuerpo secundario fue revelada por quimioluminiscencia sobre una película autorradiográfica. El sustrato de la enzima, H₂O₂, se mezcló en igual proporción con el reactivo luminol y esta mezcla fue esparcida en la membrana, la que fue separada de la película con una lámina de plástico. La señal en la película autorradiográfica fue revelada en solución de revelado y posteriormente fue fijada en solución fijadora. El tamaño esperado para β-catenina (Santa Cruz) es de alrededor de 92kDa y para α-tubulina (Sigma) es de alrededor de 50 kDa.

4.2.10.4 Cuantificación de la intensidad de bandas.

Para comparar los niveles de expresión por Western blot se cuantificó la intensidad de las bandas de α-tubulina y β-catenina. Las imágenes fueron obtenidas por digitalización de las películas fotográficas correspondientes, mediante el uso de un escáner y, convertidas a escala de grises. Con el software Image J, se seleccionó las zonas que contenían las bandas y se

cuantificó el área bajo la curva de la intensidad de las bandas. Luego los datos fueron usados para realizar gráficos.

4.2.11 Inmunofluorescencia:

4.2.11.1 Protocolo utilizado en células NSC34:

4.2.11.1.1: Fijación:

Los cultivos fueron realizados sobre cubreobjetos de vidrio de 18x18 mm en placas de 35mm. Para caracterizar tanto la morfología de las líneas celulares en diferenciación, o la localización de distintas proteínas a detectar, se utilizaron los siguientes 5 posibles métodos de fijación:

- 1) PFA 4%p/v- Sacarosa 4%p/v por 30 min a 4°C.
- 2) PFA 4%p/v- Sacarosa 4%p/v por 20 min a 4°C, un lavado con PBS e incubación en metanol 100% a -20°C por 5 min.
- 3) Formaldehido 3% 10 min a temperatura ambiente.
- 4) Metanol 100% a -20°C por 5 min.
- 5) Metanol:Acetona 1:1 5 a -20°C min.

Cada anticuerpo utilizado en este trabajo de tesis fue probado con los 5 métodos y se seleccionó, para cada uno, el que diera una señal más clara. Para ello, cuando fue posible, se incluyeron controles positivos.

4.2.11.1.2: Protocolo de inmunofluorescencia:

Para caracterizar la morfología de las líneas celulares en diferenciación, se siguió el procedimiento de inmunocitoquímica. Una vez fijadas las células,

estas fueron permeabilizadas con Tris PO₄ pH 7,4 -Tritón X-100 0,05%v/v. Luego, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario (Tabla N° 2) en cámara húmeda por 16h a 4°C. Después de 3 lavados con Tris PO₄ por 10 min, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario fluorescente (Tabla N°3) , a temperatura ambiente y oscuridad por 2h. Después de lavar con Tris PO₄, los cubreobjetos con las células adheridas fueron montados en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia y secados a temperatura ambiente.

4.2.11.2 Protocolo utilizado en miotubos primarios de ratón:

Las células fueron incubadas con α -BTX durante 1h a 37°C. Luego estas fueron lavadas con PBS 1X pH 7.4 y fijadas en paraformaldehído (PFA) 4% por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 1X 3 veces 5 min, para luego permeabilizarlas durante 30 min en PBS 1X, suero de burro 5%, BSA 1mg/ml y Tritón X-100 al 0,1%. Los anticuerpos primarios fueron incubados a 4°C toda la noche en solución de bloqueo. Una vez lavadas con PBS1X, las células fueron incubadas con anticuerpos secundarios en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. Finalmente las células fueron lavadas con PBS1X y montadas en portaobjetos de vidrio con medio de montaje acuoso. Como control, se realizó el mismo procedimiento en ausencia de incubación con anticuerpo primario.

4.2.11.3 Protocolo utilizado en cortes de médula espinal flotantes:

Los cortes flotantes fueron lavados en PBS 1X, 0,1% Tween-20, 3 veces por 10 min cada uno, e incubados con glicina 0,15 M pH 7,4 por 30 min a temperatura ambiente. Luego, los cortes fueron lavados con PBS1X una vez por 10 min e incubados con NaBH₄ 1 mg/ml por 5 min. Posteriormente, los cortes fueron lavados con PBS 1X 0,1% Tween-20, 3 veces por 10 min, para luego realizar el bloqueo con BSA 1% y la fracción Fab purificada a partir de anticuerpos que reconocen inmunoglobulinas de ratón, la cual fue utilizada a una concentración de 30 µg/ml con la finalidad de disminuir la fluorescencia de fondo ocasionada por la unión del anticuerpo secundario a las inmunoglobulinas endógenas del tejido. La solución de bloqueo fue preparada en en tampón TrisPO₄ 1X e incubada durante 1h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron incubados en TrisPO₄ 1X BSA1% en cámara húmeda a 4°C toda la noche. Los cortes flotantes fueron lavados en PBS 1X 0,1% Tween-20, posteriormente los anticuerpos secundarios fueron incubados en TrisPO₄ 1X BSA1% en cámara húmeda a 4°C toda la noche. Finalmente los cortes fueron lavados y montados entre cubreobjetos con medio de montaje para fluorescencia y secados a temperatura ambiente.

Este protocolo también fue utilizado en cultivos celulares, además de cortes de criostato adheridos al portaobjeto, postfijados con PFA4% durante 20 min a 4°C y metanol por 5 min -20°C.

4.2.11.4 Protocolo utilizado en fibras musculares aisladas:

Las fibras fueron fueron colectadas, lavadas en PBS 1X y fijadas en PFA 4% por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados por 5 min con PBS 1X. Luego, las fibras fueron incubadas con α -BTX por 15 min a temperatura ambiente con el fin de marcar el aparato postsináptico. Luego se realizaron 3 lavados por 5 min con PBS 1X, seguido de la incubación con Metanol 100% a -20°C por 5 min para permeabilizar las fibras. Posteriormente, el bloqueo se realizó en PBS 1X, Triton X-100 al 0,5%, BSA 2% por 1h a temperatura ambiente. Para algunos anticuerpos, el bloqueo se llevó a cabo utilizando suero de cabra al 5% en vez de BSA. Luego, se incubó el anticuerpo primario a 4°C toda la noche. Posteriormente, las fibras fueron lavadas 3 veces por 5 min con PBS 1X y fueron incubadas con anticuerpos secundarios 4h a temperatura ambiente. Una vez lavados en PBS1X, las fibras fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia y secados a temperatura ambiente. Este protocolo fue utilizado también para la tinción de músculo Gastrocnemio y Extensor Digitorum Longus (EDL).

4.2.11.5 Protocolo utilizado en músculo completo:

El músculo fue rápidamente disecado y fijado en PFA 4% durante 1h a 4°C . Se realizaron 10 lavados en agitación por 10 min con PBS 1X/Triton X-100 0,5% a temperatura ambiente y se incubó con glicina 0,15M pH7,4 en PBS 1X por 30 min. Después de un lavado con PBS 1X, los musculos fueron incubados con NaBH_4 10mg/ml por 5 min en agua destilada.

Posteriormente, se bloqueó con BSA 0,1% suero equino 2% en PBS 1X-Triton X-100 0,5% a 4°C toda la noche. En caso de utilizar anticuerpos secundario anti IGg de ratón, se debe añadir Fab a una concentración de 30 µg/ml. Luego, se incubó el anticuerpo primario en solución de bloqueo a 4°C toda la noche. Los músculos fueron lavados en agitación 10 veces por 10 min con PBS 1X/Triton X-100 0,5% a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó el anticuerpo secundario en solución de bloqueo a 4°C toda la noche y se realizaron nuevamente 10 lavados en agitación por 10 min con PBS 1X/Tritón X-100 0,5% a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un lavado corto con agua destilada y se escurrió en papel, para finalmente montar entre dos cubreobjetos. Este protocolo ha sido utilizado también para la tinción de músculo Gastrocnemio y EDL.

4.2.12 Ensayos de acoplamiento celular:

Las células NSC34hSOD1 fueron cultivadas sobre cubreobjetos. Después de 48h el acoplamiento fue analizado después de la microinyección de marcadores de uniones comunicantes como Amarillo de Lucifer (LY; MW 457, carga neta -2, Sigma) y neurobiotina (NB; MW 345, carga neta +1, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Después de la microinyección, las células con el trazador se incubaron 2 min a temperatura ambiente para detectar el acoplamiento, el cual fue expresado como el porcentaje de “grupos celulares acoplados”, determinados por la transferencia de marcador a al menos una célula vecina a la célula inyectada. Una vez analizadas, las

células fueron fijadas PFA4%. Para detectar la Neurobiotina las células fueron incubadas con Streptavidina conjugada a Cy3 (Sigma).

4.2.13 Adquisición de Imágenes.

Las imágenes provenientes de inmunocitoquímica fueron obtenidas mediante microscopía confocal (microscopio LSM 780 NLO, Zeiss) y microscopía de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara DS-Qi1Mc Nikon, y fueron almacenadas con el programa NIS- Elements AD 3,0, Nikon.

4.2.14 Análisis de Imágenes.

Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa Image J. Los parámetros de número y longitud de neuritas fueron cuantificados trazando manualmente la extensión de las neuritas con la herramienta “línea libre”. Para la cuantificación de número y área de estructuras de β -catenina, las estructuras fueron delimitadas de forma automática a través de la intensidad de fluorescencia. El límite mínimo de tamaño de las estructuras de β -catenina fue fijado en 1 pix^2 . Para la cuantificación de las células adheridas a la monocapa, se trazaron manualmente áreas de monocapa visualizadas en contraste de fase, las cuales fueron superpuestas con la imagen de fluorescencia, en la cual se evidencian las células teñidas con calceína-AM. Las células cuantificadas fueron las ubicadas desde el borde de la línea hacia el centro del área seleccionada.

4.2.15 Estadística.

Los datos cuantitativos se presentan expresados como la media \pm SEM, donde SEM corresponde al error estándar de la media. Para evaluar la significancia estadística se utilizó el test estadístico de ANOVA (post-test Bonferroni) y el test estadístico t de Student. Estos análisis se realizaron utilizando el software GraphPadPrism plot 5.0. Un valor $p > 0,05$ fue considerado estadísticamente no significativo (n.s), y a los valores $p < 0,05$; $p < 0,005$ y $p < 0,001$ se les asignó significancias estadísticas crecientes (*; ** y ***, respectivamente). Para $p < 0,05$ se rechaza la hipótesis nula.



5. RESULTADOS

5.1 Caracterización de la identidad neuronal en la línea celular NSC34.

Se ha descrito que los modelos in vitro de ELA, como la línea celular NSC34hSOD1^{G93A} (Gomes et al 2008) presentan deficiencias en la diferenciación neuronal (Gomes et al 2008, Lee et al 2002, Magrane et al 2009, Pinto et al 2013), evidenciado por la disminución tanto del número de células que proyectan neuritas, como de la longitud de éstas (Gomes et al 2008, Lee et al 2002, Magrane et al 2009, Pinto et al 2013).

Con el fin de analizar si estas características morfológicas están asociadas a cambios en marcadores moleculares de la diferenciación a motoneurona, se analizó la expresión de Islet-1, un factor de transcripción que se expresa en progenitores neuronales, marcando la adquisición del compromiso en la diferenciación a neuronas motoras (Ericson et al 1992a, Pfaff et al 1996b). En células NSC34hSOD1 indiferenciadas y en diferenciación, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-Islet-1 y el marcador nuclear ToPro-3. Los resultados muestran que Islet-1 se encuentra expresado de forma similar en ambas líneas celulares NSC34hSOD1 (Fig. 1a). La distribución de la fluorescencia muestra que la localización de Islet1 es preferentemente nuclear en condiciones de crecimiento y diferenciación, evidenciado por la colocalización con el marcador nuclear ToPro.

Para analizar etapas más tardías de la diferenciación a motoneuronas, se estudió la expresión del factor de transcripción Hb9, el cual es selectivamente expresado en neuronas motoras post-mitóticas durante el desarrollo (Arber et al 1999, Pfaff et al 1996b). Motoneuronas carentes de Hb9 presentan alteraciones como la migración de los precursores fuera de la médula espinal, la desfasciculación de los axones proyectados hacia los tejidos periféricos y una deficiente innervación de los músculos blanco (Arber et al 1999). Como una primera aproximación, células NSC34hSOD1 fueron analizadas por PCR convencional en condiciones indiferenciadas y diferenciadas por 24h. Los resultados muestran que la expresión del transcrito de Hb9 incrementa a las 24h de diferenciación en células NSC34hSOD1^{WT}, pero no en células NSC34hSOD1^{G93A} (Fig. 1b). Para correlacionar la expresión del transcrito con los niveles proteicos de Hb9, se realizaron ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo anti Hb9 y anti α -tubulina como control de carga. Los extractos proteicos fueron obtenidos a partir de células NSC34hSOD1 indiferenciadas, así como a las 24 y 36h de diferenciación.

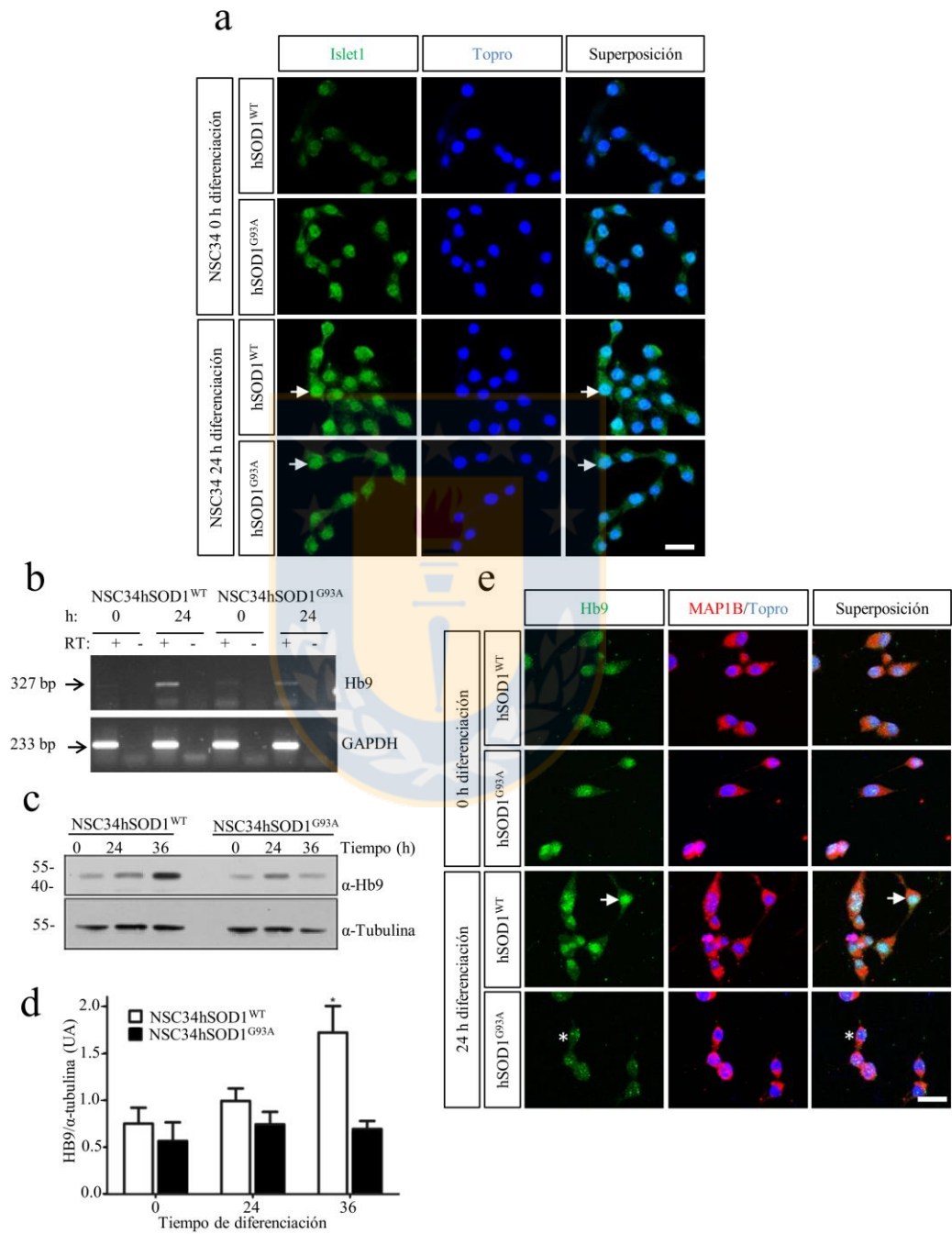


Figura 1: Expresión de marcadores de motoneurona en células NSC34hSOD1.

Células NSC34hSOD1 fueron diferenciadas y fijadas a 0 y 24h. a) Las células fueron teñidas con un anticuerpo de ratón anti Isl1 (verde panel izquierdo). Como anticuerpo secundario se usó anti-IgG de ratón acoplado a Alexa-Fluor 488. La flecha muestra la marca nuclear de Isl1 identificada con el marcador nuclear ToPro-3. Barra: 20 μ m. b) Se extrajo ARN total a las 0 y 24h de diferenciación de células NSC34hSOD1, a partir de los cuales se realizaron experimentos de RT-PCR. En el panel se muestra el gel de agarosa representativo de los productos de PCR para Hb9 (327bp) y GAPDH (233bp). c) Experimentos de Western blot fueron hechos a partir de extractos de proteína total de células NSC34hSOD1 a las 0, 24 y 36h de diferenciación. Se utilizó un anticuerpo anti-Hb9 además de un anticuerpo anti α -tubulina como control de carga. d) El gráfico muestra la cuantificación de la expresión proteica de Hb9 dado por la relación de intensidad de banda Hb9 : α -tubulina. Los datos son expresados como el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes (* p <0.05, ANOVA, post test Bonferroni). e) Células NSC34hSOD1 fueron diferenciadas y fijadas a 0 y 24h. Las células fueron doblemente teñidas con un anticuerpo de conejo anti-Hb9 (verde, panel izquierdo) y con un anticuerpo de cabra anti-MAP1B (rojo, paneles central y derecho). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de conejo acoplado a Alexa-Fluor 488 y anti-IgG de cabra acoplado a Alexa-Fluor 546. La tinción nuclear fue realizada con el marcador ToPro-3. La marca nuclear de Hb9 se observa disminuida en células

NSC34hSOD1^{G93A} (asterisco) respecto a células control hSOD1^{WT} (flecha).

Barra: 50µm. Fuente: Elaboración propia.



La cuantificación de la intensidad de banda muestra que, en condiciones de diferenciación, la expresión de Hb9 es significativamente más alta en células NSC34hSOD1^{WT} que en las células NSC34hSOD1^{G93A} (Fig. 1c, 1d). Consistente con estos resultados, el análisis mediante inmunocitoquímica muestra que aun cuando Hb9 presenta una localización nuclear en todas las condiciones, la intensidad de la fluorescencia se encuentra reducida en células NSC34hSOD1^{G93A} diferenciadas (hSOD1^{WT}: 3,4 ± 0,5; hSOD1^{G93A}: 1,4 ± 0,2; *p < 0,5; ANOVA One-way, post test Bonferroni) (Fig. 1e). Estos resultados sugieren que en una condición de ELA, aun cuando los precursores neuronales mantienen su compromiso de diferenciación a motoneuronas, existe una reducción de la capacidad de estas células para consolidar esta identidad, característica que podría contribuir a los mecanismos de origen de la patología.

La adquisición del fenotipo neuronal depende de numerosos eventos de señalización que progresivamente restringen el destino de las células progenitoras. Entre ellas, se ha descrito que las vías de señalización Wnt y BMP regulan la diferenciación de los progenitores de neuronas motoras (Chesnutt et al 2004, Nordström et al 2006, Peljto et al 2010). Por lo tanto, durante este trabajo de tesis, se ha analizado una posible relación entre la disminución de la diferenciación neuronal en ELA y la alteración de las vías Wnt y BMP que podrían impactar estadios tempranos de la patología.

5.2 Caracterización de las vías de señalización Wnt/ β -catenina y BMP/Smad en células NSC34hSOD1.

Se ha determinado que morfógenos del desarrollo, como las familias de ligandos BMP y Wnt, regulan numerosos aspectos del comportamiento neuronal (Benavente et al 2012b, Henríquez et al 2011, Salinas 2012). Más aún, diversos componentes de estas familias proteicas se expresan en el sistema nervioso adulto y han sido involucrados en neurodegeneración (Galli et al 2014, Henríquez et al 2011, Inestrosa & Arenas 2010, L'Episcopo et al 2011, Marchetti et al 2013, Purro et al 2014, Tapia-Rojas et al 2016, Wang et al 2007a).

Para estudiar el estado de activación de las vías Wnt y BMP en el modelo in vitro de ELA, se analizaron los niveles de expresión de receptores de membrana, de efectores intracelulares y la activación transcripcional dependiente de ambas vías, utilizando genes reporteros que conducen a la expresión de la proteína luciferasa.

5.2.1 Caracterización de la vía de señalización BMP-Smad en células NSC34hSOD1.

La familia de morfógenos BMP participa en procesos de diferenciación neuronal (Benavente et al 2012a, Charron & Tessier-Lavigne 2005). En células NSC34, se ha descrito que la expresión del receptor BMPRII

incrementa durante la diferenciación, a la vez que disminuye la expresión de Id1, un gen blanco de la vía BMP dependiente de Smad, cuya función se asocia a una regulación negativa de la diferenciación de precursores neurogénicos (Benavente et al 2012a).

Como una primera aproximación para estudiar el estado basal de actividad de la vía BMP, células NSC34hSOD1 indiferenciadas y diferenciadas por 24h fueron analizadas mediante PCR convencional para determinar la expresión del transcrito para BMPRII, el cual puede señalar a través de las vías dependientes e independientes de Smad (Henríquez et al 2011, Sieber et al 2009). Los resultados muestran que la expresión de BMPRII no presenta cambios durante la diferenciación de ambas líneas celulares NSC34hSOD1 (Fig. 2a, 2b), ni presenta diferencias entre las condiciones hSOD1^{WT} y hSOD1^{G93A} (Fig. 2a, 2b).

Con el fin de analizar efectores intracelulares de la vía BMP se realizaron experimentos de Western blot para detectar la fosforilación de las proteínas Smad1/5/8, modificación post-traducciona crucial en la activación de la vía BMP dependiente de Smad (Henríquez et al 2011). Similar a hallazgos previos en la línea NSC34 (Benavente et al 2012b), los niveles de la proteína Smad fosforilada (pSmad) en ambas líneas celulares NSC34hSOD1 disminuyen durante la diferenciación (Benavente et al 2012b). Por otra parte, al analizar la condición indiferenciada, se puede observar que los niveles de pSmad son significativamente mayores en células NSC34hSOD1^{G93A} en

comparación con las células NSC34hSOD1^{WT} (hSOD1^{WT}: 1,9 ±0,25; hSOD1^{G93A}: 3,5 ± 0,2; ***p< 0,001; ANOVA One-way, post test Bonferroni) (Fig. 2c, 2d).

Para correlacionar los niveles de pSmad con la activación transcripcional de la vía BMP, se analizó mediante Western blot la expresión de Id1. Los resultados muestran la disminución de la expresión de Id1 en condiciones de diferenciación en ambas líneas celulares, como se ha demostrado previamente (Benavente et al 2012b). De forma similar al comportamiento de pSmad, el análisis en la condición indiferenciada muestra que los niveles de Id1 fueron significativamente mayores en células NSC34hSOD1^{G93A} en comparación con las células control (hSOD1^{WT}: 1,3 ±0,05; hSOD1^{G93A}: 2,3 ± 0,23; ***p< 0,001; ANOVA One-way, post test Bonferroni) (Fig. 2e, 2f).

Finalmente, se determinaron los niveles de activación transcripcional dependiente de Smad durante la diferenciación de células NSC34hSOD1. Para ello, las células fueron transfectadas de manera transiente con el gen reportero luciferasa-Id1, el cual comanda la expresión de la proteína luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de Id1, que contiene elementos de respuesta a Smad (López-Rovira et al 2002). Posteriormente, las células fueron analizadas en condiciones indiferenciadas, así como a las 24 y 36h de diferenciación. Los resultados muestran que en la condición indiferenciada existe un incremento de dos veces en la activación transcripcional en células NSC34hSOD1^{G93A} en comparación a las células

control (hSOD1^{G93A}: 2,214±0,427; normalizado a la condición hSOD1^{WT} 0h=1,00; * p<0,05 ANOVA One-way, post test Bonferroni) (Fig. 2g). Por otra parte, la actividad del gen reportero disminuye durante la diferenciación en la línea celular NSC34hSOD1^{G93A} (0h: 2,214±0,427; 36h: 0,561±0,166; normalizado a la condición hSOD1^{WT} 0h= 1,00; **p<0,01 ANOVA One-way Bonferroni), mientras que en la línea celular NSC34hSOD1^{WT} no se observan modificaciones (Fig 2g). En su conjunto, estos hallazgos indican que la actividad de vía de señalización BMP está incrementada en células NSC34 indiferenciadas que expresan la proteína hSOD1^{G93A}.

5.2.2 Caracterización de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en células NSC34hSOD1.

La activación de la señalización Wnt/ β -catenina depende de la unión de un ligando Wnt a un receptor Frizzled y al co-receptor LRP5/6 expresados en la membrana (Logan & Nusse 2004). Los niveles de expresión de los distintos receptores Fzd permiten, entre otros mecanismos, regular los diferentes roles de los ligandos Wnt. Al respecto, en médula espinal de ratones transgénicos sintomáticos que expresan hSOD1^{G93A}, se ha observado el incremento de los transcritos de todos los receptores Fzd por medio de análisis de micromatrices de ARN (Li et al 2013a, Wang et al 2013, Yu et al 2013).

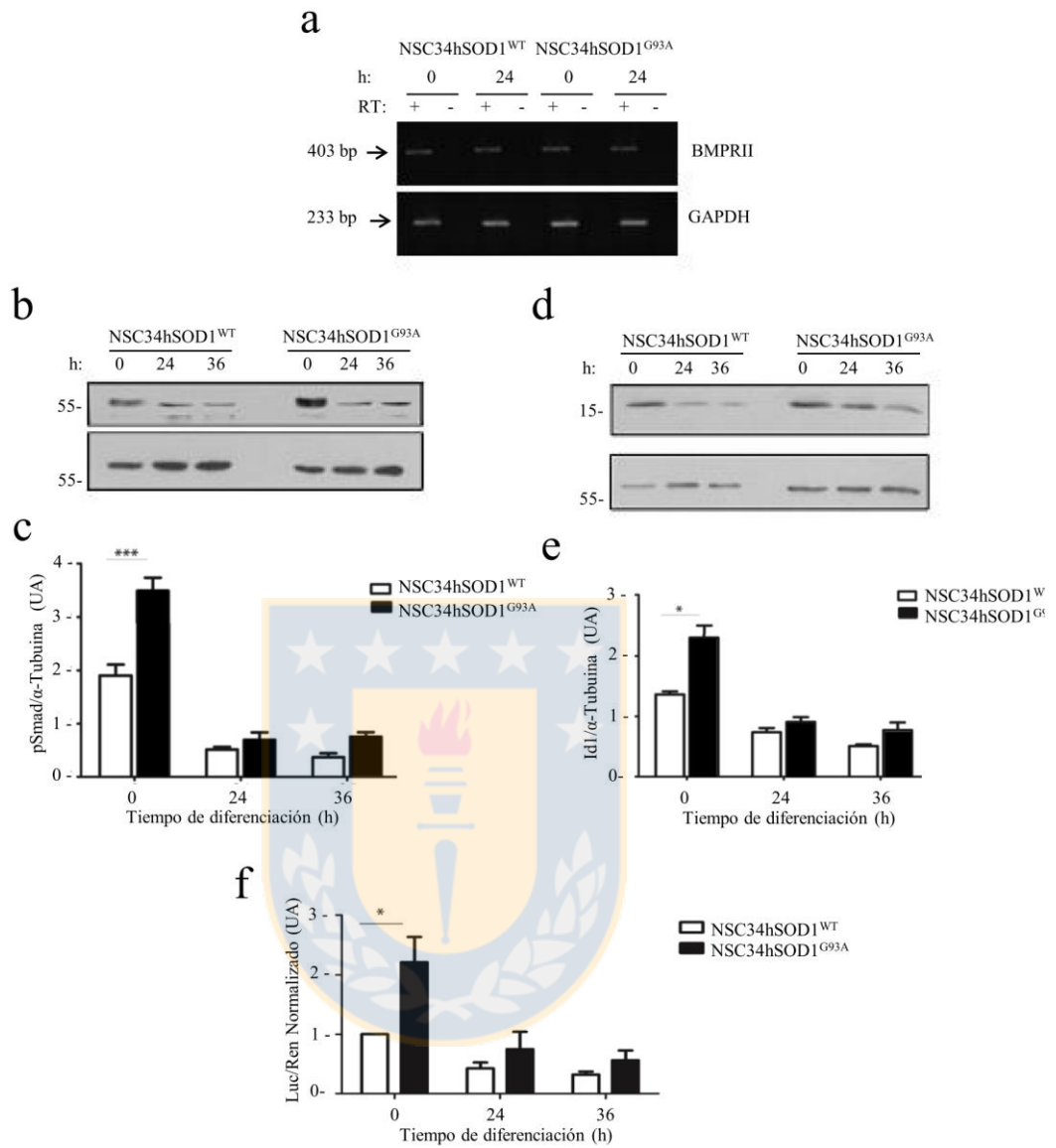


Figura 2: Determinación de la actividad de la vía de señalización BMP/Smad en células NSC34hSOD1.

(a) Se extrajo ARN total a las 0 y 24h de diferenciación de células NSC34hSOD1, a partir de los cuales se realizaron experimentos de RT-PCR. En el panel se muestra un gel de agarosa representativo de los productos de RT-PCR para BMPRII (bp) y β -actina (250bp). (b) El gráfico representa la cuantificación de la expresión relativa de BMPRII de ratón normalizada a β -actina. Los datos son expresados como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (n.s. = $p > 0,5$; ANOVA post-test Bonferroni). (c) Experimentos de Western blot fueron hechos a partir de extractos de proteína total obtenidos de células NSC34hSOD1 a las 0, 24 y 36h de diferenciación. Se utilizaron anticuerpos anti-pSmad (c) y anti Id-1 (e). Los niveles de α -tubulina se utilizaron como control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de pSmad (d) e Id1 (f) dado por la relación de intensidad de cada banda respecto a las bandas de α -tubulina. Los datos son expresados como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; ANOVA post-test Bonferroni). (g) Células NSC-34hSOD1 fueron transfectadas con un gen reportero que contiene elementos de respuestas a Smad1 en su promotor que comandan la expresión de luciferasa (pId1-Luc). Las células transfectadas fueron diferenciadas por 24 y 36h. Los resultados corresponden a la actividad del gen reportero normalizada (Luciferasa/Renilla). Se graficó el promedio \pm SEM de cuatro experimentos

independientes realizados por triplicado (* $p < 0.05$; ANOVA post-test Bonferroni. Fuente: Elaboración propia.



Como una primera aproximación para caracterizar los componentes de la vía Wnt durante la diferenciación de células NSC34hSOD1, se analizó por PCR convencional la expresión de los receptores Fzd4 y Fzd6, por encontrarse entre los receptores con mayor y menor sobreexpresión respectivamente, en somas de motoneuronas de modelos de ELA en estadios sintomáticos (Yu et al 2013). Los resultados indican que la expresión del ARNm de Fzd4 en células NSC34hSOD1G93A incrementa significativamente durante la diferenciación (hSOD1G93A 0h: $0,407 \pm 0,194$; hSOD1G93A 24h: $2,085 \pm 0,190$; normalizado a la condición hSOD1WT 0h= 1,00; ANOVA One-way, post test Bonferroni $**p < 0,01$). El análisis a las 24h de diferenciación, mostró que la expresión del transcrito de Fzd4 es significativamente mayor en células NSC34hSOD1G93A que en células NSC34hSOD1WT (hSOD1WT 24h: $1,181 \pm 0,263$; hSOD1G93A 24h: $2,085 \pm 0,190$; normalizado a la condición hSOD1WT 0h =1,00; $***p < 0,001$; ANOVA One-way, post test Bonferroni) (Fig. 3a). Por otra parte, el análisis de la expresión del transcrito del receptor Fzd6 no muestra cambios significativos entre las líneas celulares NSC34hSOD1. Estos resultados indican un incremento de la expresión de Fzd4 durante la diferenciación neuronal en células que expresan la proteína hSOD1G93A,

La activación de la vía canónica puede ser antagonizada por el inhibidor Dickkopf 1 (Dkk1) (Mao et al 2001). En modelos de EA, se ha descrito el incremento del transcrito del Dkk1 en cerebro de pacientes y ratones transgénicos (Caricasole et al 2004, Purro et al 2012, Rosi et al 2010). Se analizaron células NSC34hSOD1 indiferenciadas y diferenciadas por 24h

para determinar la expresión de Dkk1 por medio de PCR convencional. Los resultados muestran un incremento en el ARNm de Dkk1 en células NSC34hSOD1G93A respecto a las células NSC34hSOD1WT en condiciones indiferenciadas (hSOD1G93A 0h: $2,10 \pm 0,47$; normalizado a la condición hSOD1WT 0h = 1,00; * $p < 0,05$; ANOVA One-way, post test Bonferroni) (Fig. 3d, 3e). El análisis en células NSC34hSOD1G93A en diferenciación muestra que la expresión de Dkk1 disminuye significativamente respecto a su condición indiferenciada (hSOD1G93A 0h: $2,10 \pm 0,47$; hSOD1G93A 24h: $0,894 \pm 0,092$; normalizado a la condición hSOD1WT 0h = 1,00; * $p < 0,05$; ANOVA One-way, post test Bonferroni) (Fig. 3d, 3e).

Estos resultados muestran que en precursores de motoneuronas que expresan hSOD1G93A existe un incremento de la expresión del inhibidor de la vía Wnt/ β catenina Dkk1 respecto a la expresión en células control.

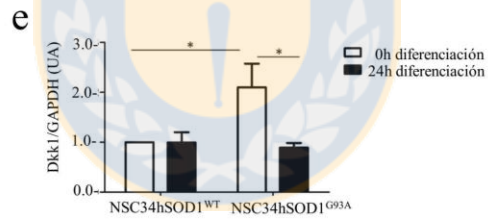
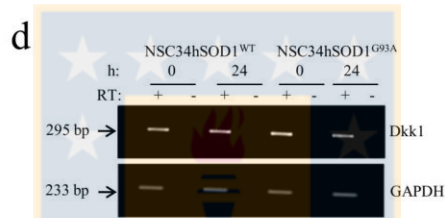
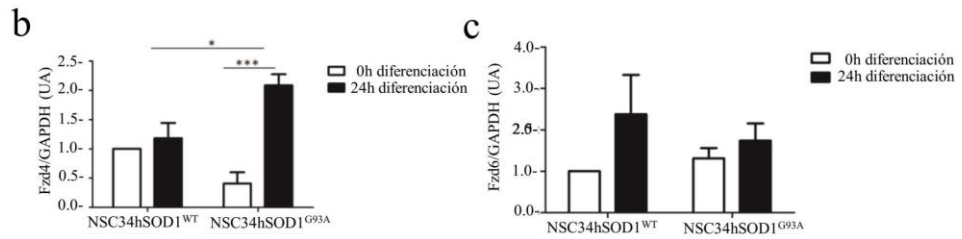
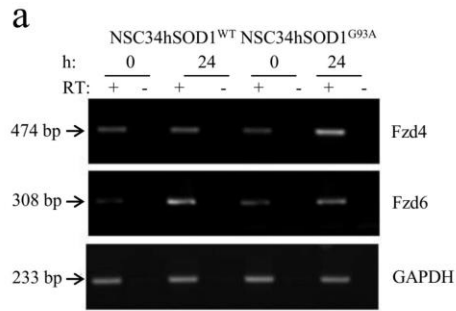
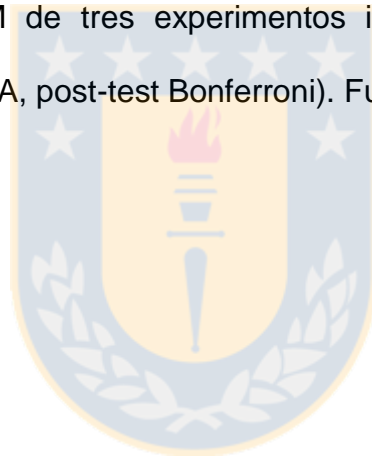


Figura 3: Expresión de receptores Fdz y Dkk1 en células NSC34hSOD1.

a) Figura 3: Expresión de receptores Fdz y Dkk1 en células NSC34hSOD1.

Se extrajo ARN total a 0 y 24h de diferenciación, a partir de los cuales se realizaron experimentos de RT-PCR. Se muestran geles de agarosa representativos de los productos de RT-PCR para Fzd4 (474bp), Fzd6 (308bp) (a), Dkk1 (295bp) (d) y GAPDH (233bp) como control interno de expresión. Se graficó la cuantificación de la expresión relativa de Fz4 (b), Fzd6 (c) y Dkk1 (e) normalizada a GAPDH. Los datos son expresados como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes, (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; n.s.; ANOVA, post-test Bonferroni). Fuente: Elaboración propia.



Para ejercer sus efectos biológicos, la activación de la vía Wnt canónica resulta en una acumulación del efector intracelular β -catenina en el citoplasma (Logan & Nusse 2004). Para continuar la caracterización de la vía de señalización Wnt, se analizó el perfil de distribución de β -catenina en células NSC34hSOD1. El análisis muestra que en grupos celulares de la línea NSC34hSOD1^{WT}, β -catenina puede ser localizada en puntos focales en las uniones intercelulares. Sin embargo, en células NSC34hSOD1^{G93A}, β -catenina se presenta en estructuras en apariencia más numerosa y de mayor tamaño que en células NSC34hSOD1^{WT} (Pinto et al 2013). Para determinar los niveles de activación transcripcional dependientes de la vía Wnt, células NSC34hSOD1 fueron transfectadas de manera transiente con el reportero luciferasa TopFlash, el cual contiene secuencias consenso de activación mediante factores de transcripción TCF/LEF, y fueron analizadas en condiciones indiferenciadas, a las 24 y 36h de diferenciación. Los resultados muestran que en células NSC34hSOD1^{WT} la actividad del reportero incrementa significativamente con la diferenciación (hSOD1^{WT} 36h: 1,845±0,334; normalizado a la condición hSOD1^{WT} 0h= 1,00; *p<0,05; test t pareado) mientras que en las células NSC34hSOD1^{G93A}, tanto en condiciones de crecimiento como de diferenciación, la actividad del reportero se mantiene constante durante la diferenciación (Pinto et al 2013). Estos resultados indican que las células modelo de motoneuronas de ELA presentan una incapacidad para activar la vía Wnt durante la diferenciación.

Una característica de las enfermedades neurodegenerativas es la agregación asociada al plegamiento anormal de proteínas (Wood et al 2003a). Estos agregados son de diversa naturaleza e inmunorreactivos a diversas proteínas (Wood et al 2003a) siendo evidentes, en el caso de los ratones que sobreexpresan hSOD1^{G93A}, al inicio de la enfermedad, e incrementando durante la progresión de ésta (Bruijn et al 1998, Bruijn et al 2004a). Debido a la distribución de β -catenina en estructuras numerosas y de gran tamaño en células que expresan la mutación hSOD1^{G93A}, en este trabajo de tesis se ha evaluado la posibilidad de que ellas estén relacionadas con la capacidad de formar agregados citoplasmáticos que influyan en los mecanismos de neurodegeneración en ELA.

5.2.3 β -catenina se distribuye en estructuras tipo agregados en un modelo animal de ELA.

Se ha descrito en enfermedades neurodegenerativas, como en EA, la formación de agregados de fosfo- β -catenina en cerebro de pacientes (Ghanevati & Miller 2005). Además, en muestras proteicas de cerebro de pacientes post-mortem con EH se ha demostrado la estabilización de β -catenina destinada a degradación, reflejado en un aumento en los niveles de esta proteína (Godin et al 2010). Por otra parte, en médula espinal de ratones transgénicos que sobreexpresan hSOD1^{G93A}, modelo in vivo de ELA, se ha mostrado la disminución de la localización de β -catenina en el núcleo de las neuronas motoras (Zhang et al 2006).

Para analizar si las estructuras de β -catenina descritas en las células NSC34hSOD1^{G93A} (Pinto et al 2013) se encuentran presentes en un modelo in vivo de ELA, médulas espinales de ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína hSOD1^{G93A}, así como de animales control (que expresan hSOD1^{WT}) fueron analizadas mediante inmunocitoquímica, en estadios sintomáticos (P130) y presintomáticos (P76) de la enfermedad.

Criosecciones obtenidas a partir de ratones en estadios sintomáticos fueron teñidas con anticuerpos anti-neurofilamento, anti-acetiltransferasa de colina (ChAT) y anti- β -catenina. Los resultados muestran que en médulas espinales de la condición control, β -catenina se encuentra mayormente localizada en el núcleo de las motoneuronas (Fig. 4a panel superior, flecha), evidenciadas por la colocalización entre las marcas para neurofilamentos y ChAT. En médulas espinales provenientes de ratones transgénicos, la distribución nuclear de β -catenina se observa menos intensa en relación a las motoneuronas control (Fig. 4a panel inferior, asterisco).

Para determinar si la distribución de β -catenina cambia durante la progresión de la enfermedad, cortes de crióstato obtenidos de médulas espinales de ratones presintomáticos fueron teñidos con un anticuerpo anti- β -catenina. Los resultados muestran una localización preferentemente nuclear de β -catenina, con igual intensidad en ambos genotipos. Sin embargo, de forma interesante, β -catenina se distribuye además formando estructuras citoplasmáticas en motoneuronas provenientes de ratones hSOD1^{G93A} (Fig.

4b flecha amarilla). Estos hallazgos indican que en etapas tardías de ELA la distribución nuclear de β -catenina en motoneuronas se encuentra disminuida, mientras que en estadios presintomáticos β -catenina se distribuye en estructuras citosólicas en motoneuronas que expresan hSOD1^{G93A}, en concordancia con los análisis realizados en células NSC34hSOD1^{G93A} (Pinto et al 2013).



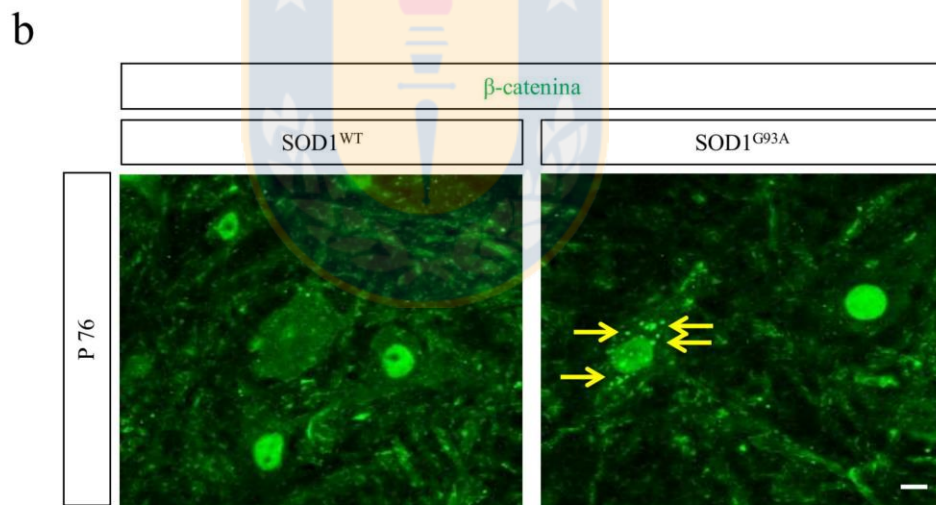
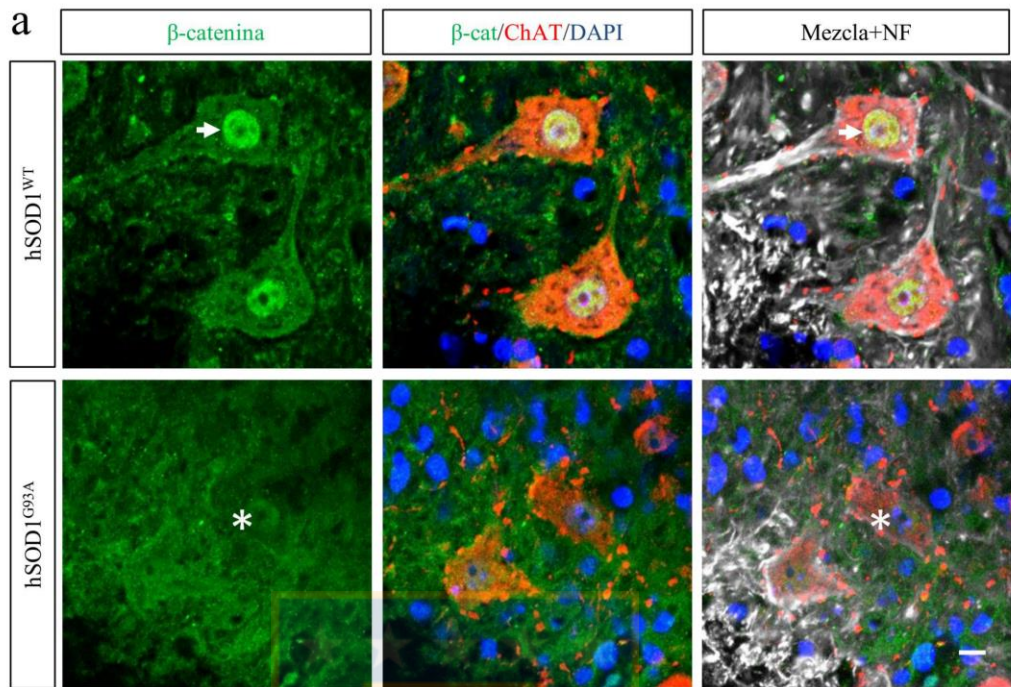


Figura 4. Distribución de β -catenina en motoneuronas de ratones transgénicos hSOD1^{G93A}.

a) Crio secciones de médula espinal en etapa sintomática (P130) de ratones control y hSOD1^{G93A} fueron teñidas con anticuerpos anti β -catenina (verde, panel izquierdo), ChAT (rojo, panel medio) y Neurofilamento NF (Blanco, panel derecho). Los núcleos fueron marcados con DAPI. Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de conejo acoplado a CyTM2, anti-IgG de cabra acoplado a Alexa-Fluor 546 y anti-IgG de ratón acoplado a CyTM5. Se observa la disminución de la tinción nuclear de β -catenina en la condición ELA (asterisco), respecto de la condición control (flecha), en células positivas para ChAT (panel medio y superposición). b) Crio secciones de médulas espinales en estadios presintomáticos (P76) teñidos con un anticuerpo anti β -catenina. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo acoplado a CyTM2. El soma de las neuronas motoras de ratones hSOD1^{G93A} muestra estructuras agregadas de β -catenina (flechas amarillas), ausentes en animales control. Barra 10 μ m. Fuente: Elaboración propia.

5.2.4 β -catenina se distribuye en estructuras tipo agregados en modelo in vitro NSC34hSOD1.

En modelos in vitro de diversas enfermedades neurodegenerativas, se ha descrito la alteración de la distribución de β -catenina. En cultivo de fibroblastos de pacientes con mutaciones en la proteína presnilina-1, una proteína involucrada en EA y EP, se ha descrito un cambio en la distribución de β -catenina, la cual presenta una disminución de la capacidad para translocar al núcleo (Nishimura et al 1999). Por otra parte, se ha demostrado la estabilización de β -catenina fosforilada para degradación en células HEK293 que expresan huntingtina poliglutaminada, un modelo in vitro de EH (Godin et al 2010).

Para determinar si las estructuras de β -catenina observadas in vivo e in vitro están asociadas a algún mecanismo patológico de ELA, ellas fueron estudiadas durante el desarrollo de esta tesis en células NSC34 que expresan de manera estable las proteínas hSOD1^{WT} o hSOD1^{G93A}. Las observaciones iniciales de las estructuras de β -catenina indican que ellas se presentan sólo en células NSC34hSOD1^{G93A} indiferenciadas y diferenciadas (Pinto et al 2013), encontrándose aparentemente de manera más abundante en condiciones indiferenciadas. Debido a ello, la condición indiferenciada será utilizada con la finalidad de caracterizar la abundancia y tamaño de las estructuras de β -catenina.

Para comenzar a caracterizar la distribución de β -catenina, a partir de extractos de proteína citosólica, se realizaron ensayos de Western blot con anticuerpos anti- β -catenina y anti- α -tubulina como control de carga (Fig. 5a). El panel muestra un triplete de bandas, en las cuales se encuentra la banda principal de 86kD, y dos bandas de alto peso molecular, como ha sido descrito (Aberle et al 1997). La cuantificación de la intensidad de bandas muestra que los niveles citosólicos de β -catenina en células NSC34hSOD^{G193A} son significativamente mayores en comparación a las células control (** $p < 0,01$, test t pareado) (Fig. 5b).

Para relacionar los niveles de β -catenina con su distribución, la localización de β -catenina fue analizada por inmunofluorescencia en células NSC4hSOD1 (Fig. 5c). Con el fin de cuantificar la distribución de β -catenina, se definió una “estructura” como un área fluorescente con la misma intensidad de fluorescencia en todos los puntos que lo conforman. Estas estructuras fueron delimitadas de forma automática con el programa ImageJ, lo que permitió la cuantificación de parámetros como el número de estructuras por célula y el área de las mismas. La cuantificación del número de estructuras muestra que las células NSC34hSOD1^{G93A} presentan una mayor cantidad de estructuras de β -catenina por célula en comparación a las células control (hSOD1^{WT}: $0,7747 \pm 0,1388$; hSOD1^{G93A}: $2,944 \pm 0,4822$; * $p < 0,05$, test t pareado) (Fig. 5c, 5d). Adicionalmente, se analizó el tamaño de las estructuras de β -catenina. Los resultados muestran un incremento de aproximadamente el doble de área promedio de las estructuras de β -

catenina presentes en células NSC34hSOD^{G193A}, en comparación a las células control (hSOD1^{WT}: 0,2980 ± 0,01115 μm²; hSOD^{G193A}: 0,6128 ± 0,07296 μm², *p< 0,05, test t pareado) (Fig. 5c, 5e). Con el fin de determinar la distribución de áreas de estructuras de β-catenina presentes en células NSC34hSOD1^{G93A}, se realizó un histograma de distribución en distintos intervalos de áreas, el cual muestra un incremento significativo en el porcentaje de estructuras de β-catenina con áreas mayores a 1μm² en células NSC34hSOD1^{G93A}, en comparación a las células NSC34 hSOD1^{WT} (hSOD1^{WT}: 5,096 ± 1,286% hSOD1^{G93A}: 14,50 ± 2,065%, *p< 0,05 ANOVA 2-way, post-tet Bonferroni). Este incremento se correlaciona con el análisis de estructuras de β-catenina en el intervalo de áreas inferiores de 0,2μm², en el cual las cuantificaciones muestran la disminución significativa del porcentaje de estructuras inferiores de 0,2μm² en las células NSC34hSOD1^{G93A} en comparación a las células NSC34hSOD1^{WT} (hSOD1^{G93A}: 40,53 ± 2,872%; hSOD1^{WT}: 55,05 ± 3,295% ***p< 0,001, ANOVA 2-way, post-test Bonferrini) (Fig. 5f).

En su conjunto, estos hallazgos muestran la presencia de un mayor número de estructuras de β-catenina y de mayor tamaño en células NSC34 que expresan la proteína hSOD1^{G93A} en comparación a las células control, indicando la posibilidad de que estas estructuras formen algún tipo de agregados intracelulares, característica celular presente en motoneuronas en una condición de ELA.

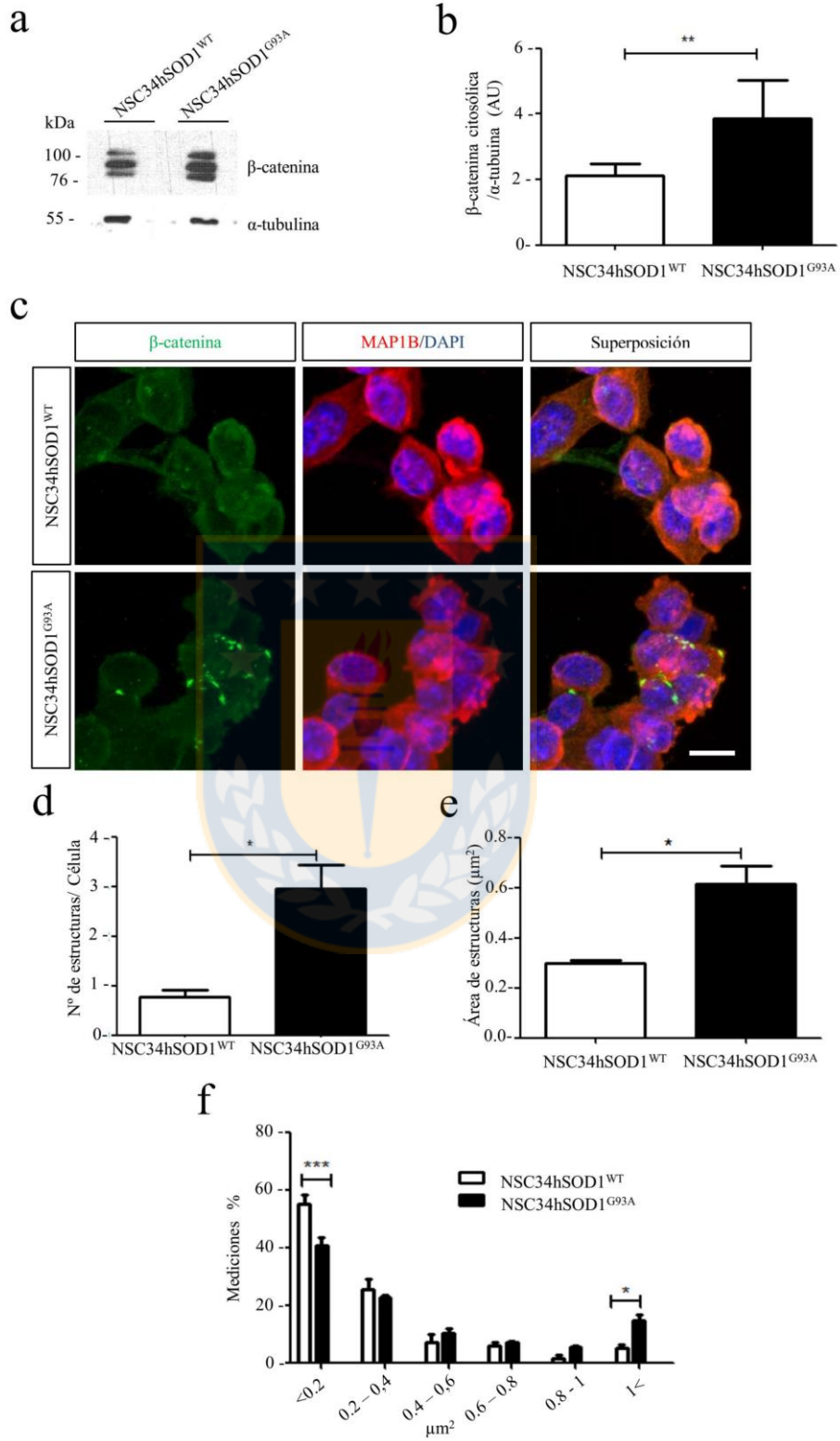


Figura 5. Análisis de distribución de β -catenina en células NSC34hSOD1.

a) Se obtuvieron extractos de proteínas citosólicas de células NSC34hSOD1 para análisis de Western blot usando un anticuerpo anti- β -catenina. Los niveles de α -tubulina se muestran como control de carga. b) El gráfico muestra la cuantificación de la expresión de β -catenina dado por la relación de intensidad de banda β -catenina: α -tubulina. Se graficó el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (** $p < 0,01$; test t pareado). c) Células NSC34hSOD1 indiferenciadas fueron cultivadas, fijadas y doblemente teñidas con un anticuerpo de ratón anti- β -catenina (verde, panel izquierdo) y un anticuerpo de cabra anti-MAP1B (rojo, panel medio). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de ratón conjugado a CyTM2 y anti-IgG de cabra conjugado a Alexa-Fluor 546. Se observa la distribución de las estructuras de β -catenina en la condición ELA (asterisco). d) El gráfico muestra la cuantificación del número de estructuras de β -catenina por célula. Los datos son expresados como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; test t pareado). e) El análisis de tamaño muestra la cuantificación del área promedio de estructuras de β -catenina expresados en μm^2 , donde se graficó el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; test t pareado). f) Se muestra la distribución de rangos de áreas de estructuras de β -catenina, lo que se graficó como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; ANOVA post-test Bonferroni). Se observa un incremento en el número y tamaño de las estructuras de β -

catenina en células NSC34hSOD1^{G93A}. Barra 10µm. Fuente: Elaboración propia.



5.3 Caracterización de la naturaleza de las estructuras de β -catenina en el modelo in vitro de ELA.

5.3.1 Estudio de localización de β -catenina junto a agregados proteicos en células NSC34hSOD1.

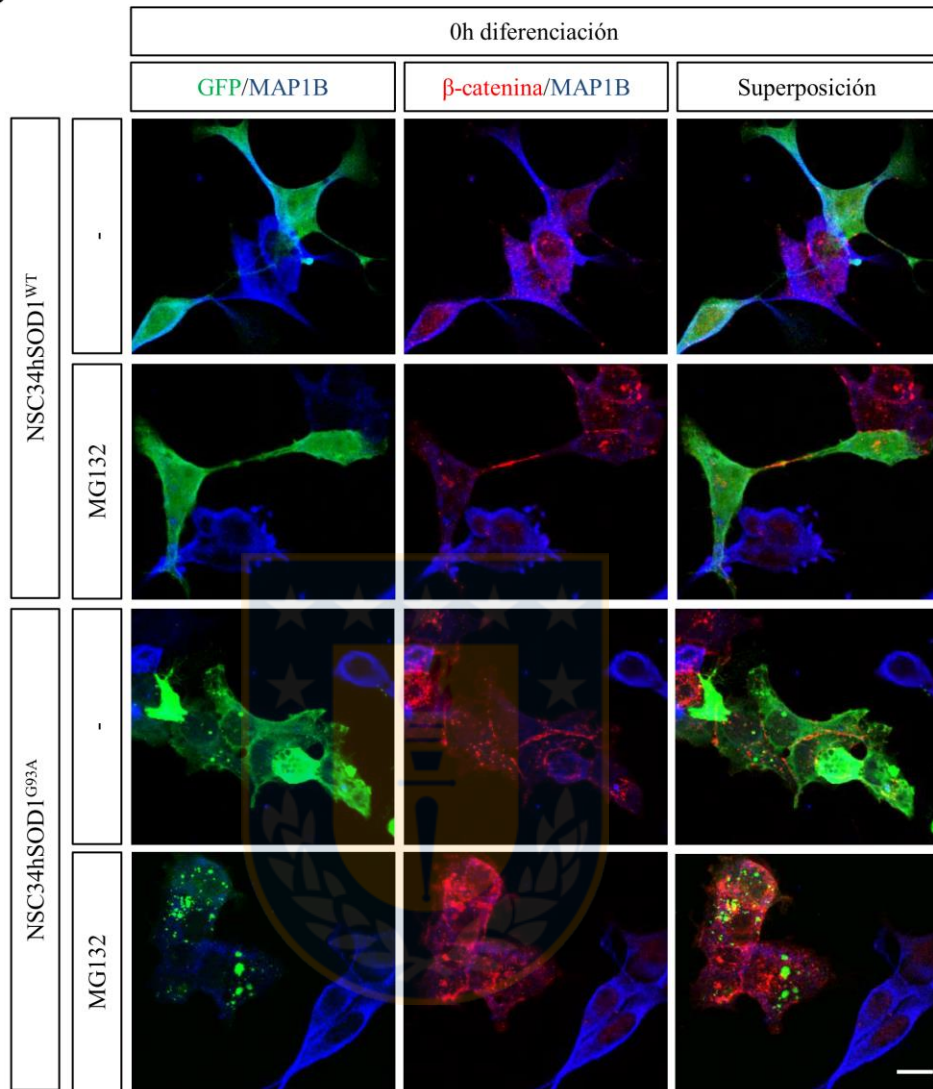
Los agregados intracelulares son una característica de varias enfermedades neurodegenerativas como EA, EP, EH y ELA. Se ha descrito que β -catenina forma parte de estructuras agregadas en modelos in vitro e in vivo de la EA (Ghanevati & Miller 2005, Godin et al 2010). Para determinar si las estructuras de β -catenina pertenecen a un agregado proteico específico, se analizó la distribución de β -catenina junto a proteínas características de procesos celulares que resultan en la formación de dichas estructuras.

5.3.1.1 Estudio de localización de β -catenina respecto a agregados de hSOD1^{G93A} en células NSC34.

Se ha descrito que la agregación de la proteína SOD1 mutada es uno de los eventos involucrados en la neurodegeneración de motoneuronas en modelos in vivo de ELA (Ajroud-Driss & Siddique 2015, Ip et al 2011, Pasinelli & Brown 2006). Para determinar si las estructuras de β -catenina colocalizan con agregados de hSOD1 mutada, células NSC34 fueron transfectadas con plásmidos que codifican para las proteínas hSOD1^{WT} o hSOD1^{G93A}, ambas

fusionadas a GFP. La inhibición de la función del proteosoma en células NSC34 que expresan GFP-hSOD1^{G93A} induce la formación de agregados intracelulares, no así en células que expresan GFP-hSOD1^{WT} (Onesto et al 2011). Así, con la finalidad de inducir la formación de agregados de la proteína hSOD1 mutada, las células NSC34 transfectadas fueron tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 (Onesto et al 2011), utilizando DMSO como control. Posteriormente, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti β -catenina y anti MAP1B. Los resultados muestran que el tratamiento con MG132 induce la formación de agregados GFP positivos sólo en células NSC34 que expresan hSOD1^{G93A} (Fig. 6a). El análisis de la distribución de β -catenina muestra la formación de estructuras preferentemente en células transfectadas con hSOD1^{G93A}. Sin embargo, al realizar la superposición de ambas marcas, éstas no muestran colocalización (Fig. 6a), evidenciada también por la reconstrucción 3D para GFP, β -catenina y DAPI (Fig. 6b). Estos resultados indican que in vitro, las estructuras de β -catenina no forman parte de agregados proteicos de hSOD1.

a



b

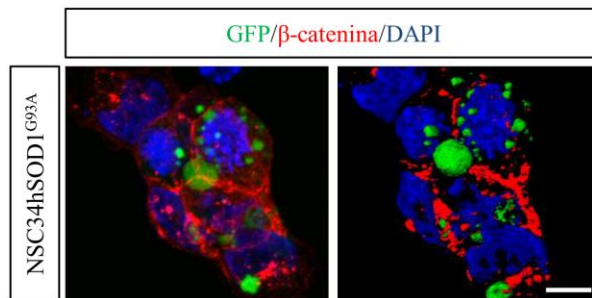


Figura 6. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a agregados de hSOD1^{G93A}-GFP en células NSC34.

a) Células NSC34 fueron transfectadas con plásmidos que codifican para la proteína hSOD1^{WT} o hSOD1^{G93A} fusionada a GFP por 24h. Las células transfectadas fueron tratadas con MG132 10 μ M durante 6h para inducir la formación de agregados de hSOD1-GFP. Posteriormente, las células fueron fijadas y doblemente teñidas con un anticuerpo de ratón anti β -catenina (rojo, panel central y derecho) y un anticuerpo de cabra anti MAP1B (azul). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-IgG de ratón acoplado a CyTM3 y anti-IgG de cabra acoplado a CyTM5. b) Reconstrucción 3D de los planos de fotografías obtenidas por microscopía confocal. Se muestran células NSC34hSOD1^{G93A} que expresan agregados positivos a GFP (verde) y teñidas contra β -catenina (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra= 10 μ m. Fuente: Elaboración propia.

5.3.1.2 Estudio de localización de β -catenina respecto a agregados de vías de degradación proteica en células NSC34hSOD1.

La acumulación de proteínas conjugadas a ubiquitina es una característica histológica en modelos de enfermedades neurodegenerativas (Ghanevati & Miller 2005), incluyendo modelos de ELAf y ELAe, en los cuales se ha descrito ampliamente la disfunción del sistema ubiquitina proteosoma (UPS) (Bendotti et al 2012, Bruijn et al 2004b, Chung et al 2001). Para estudiar si las estructuras de β -catenina se encuentran relacionadas a agregados ubiquitinados, células NSC34hSOD1 fueron tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 (Onesto et al 2011), utilizando DMSO como control. Estas células fueron fijadas y sometidas a inmunolocalización con anticuerpos anti β -catenina y anti-Ubiquitina. Los resultados muestran la formación de agregados de Ubiquitina en presencia de MG132 en ambos tipos celulares (Fig. 7a). Las estructuras de β -catenina se observan abundantes y de mayor tamaño en células NSC34hSOD1^{G93A} (Fig. 7b). Al realizar la superposición, se puede observar que las señales de fluorescencia para β -catenina y Ubiquitina no co-distribuyen (Fig. 7A), exceptuando eventos de colocalización poco frecuentes por campo. La distribución de β -catenina y Ubiquitina se corroboró con reconstrucciones 3D (Fig. 7b). En ellas se observa que ambas marcas son independientes una de la otra. Más aún, al analizar los eventos en que se observa colocalización, la modificación del ángulo en la proyección 3D muestra que ambas marcas se encuentran adyacentes y no forman parte de la misma estructura (Fig. 7b).

Estos resultados sugieren que las estructuras de β -catenina no se encuentra formando parte de agregados ubiquitinados.

Un mecanismo de degradación proteica activado en compensación a la disfunción del UPS es la autofagia (Pandey et al 2007). En ella, se produce la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, cuyo principal marcador es la proteína LC3. La activación de la autofagia ha sido asociada a pacientes con ELAf y ELAe, mostrando un incremento de los niveles de proteínas asociadas a autofagia como Beclin-1 y LC3-II (Hetz et al 2009). Para estudiar si las estructuras de β -catenina se encuentran relacionadas a la formación de autofagosomas, células NSC34hSOD1 fueron tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 (Onesto et al 2011), utilizando DMSO como control. Estas células fueron fijadas y sometidas a inmunolocalización con anticuerpos anti β -catenina y anti-LC3. Los resultados muestran que la inhibición del proteosoma induce la formación de un patrón punteado de LC3 en ambas líneas celulares NSC34hSOD1, siendo más abundante en células NSC34hSOD1^{G93A} (Fig. 7c). Sin embargo, al realizar la superposición de las imágenes con las de la tinción de β -catenina, se puede observar que las señales de fluorescencia para β -catenina y LC3 no co-distribuyen (Fig. 7c).

Cuando la producción de proteínas mal plegadas sobrepasa la capacidad del proteosoma, estas proteínas y agregados pueden ser transportados a agrosomas, estructuras multiproteicas caracterizadas por la presencia de

vimentina y γ -tubulina (Garcia-Mata et al 2002, Kopito 2000). Para determinar si β -catenina se encuentra en inclusiones tipo agresomas, en células NSC34hSOD1 se realizaron ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos anti β -catenina y anti γ -tubulina (Johnston et al 1998). Los resultados muestran que γ -tubulina presenta una localización restringida a la periferia nuclear en ambas líneas celulares NSC34hSOD1 (Fig. 8). Al analizar la superposición de la distribución de ambas proteínas es posible distinguir que β -catenina no colocaliza con γ -tubulina, sugiriendo que las estructuras de β -catenina no se encuentra formando inclusiones en agresomas. En su conjunto, estos resultados indican que las estructuras de β -catenina no se encuentran formando parte de agregados asociados a vías de degradación proteica.

5.3.1.3 Estudio de localización de β -catenina respecto a agregados amiloides en células NSC34hSOD1.

La presencia de agregados proteicos ricos en motivos hoja β ha sido ampliamente descrita en enfermedades neurodegenerativas (Soto 2003). Los agregados de hSOD1 mutada en modelos de ELA familiar y Ubiquitina en modelos esporádicos han mostrado no ser amiloides (Kerman et al 2010). Sin embargo, algunas inclusiones de la proteína TDP-43 en modelos de ELA son positivas a colorantes amiloides (Bigio et al 2013). Para determinar si las estructuras de β -catenina están relacionadas con estructuras amiloides, células NSC34hSOD1 fueron teñidas con Tioflavina-T (ThT), colorante

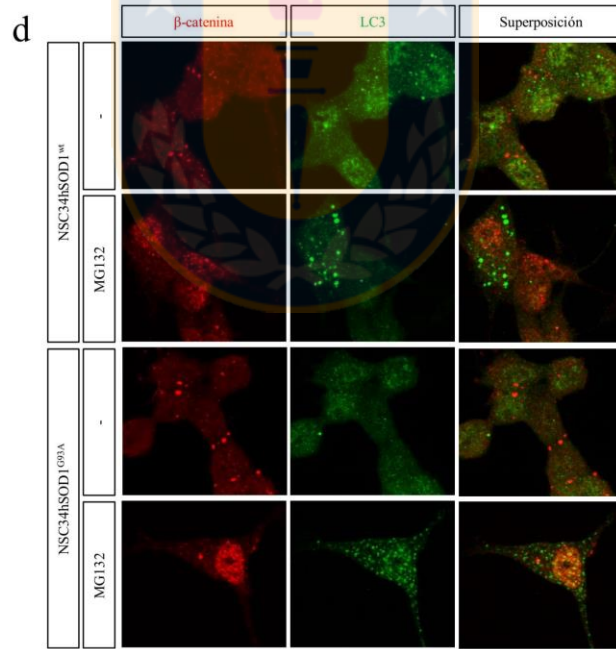
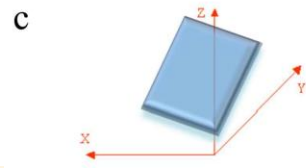
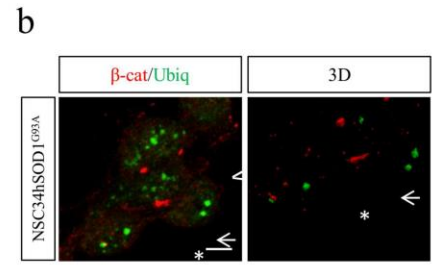
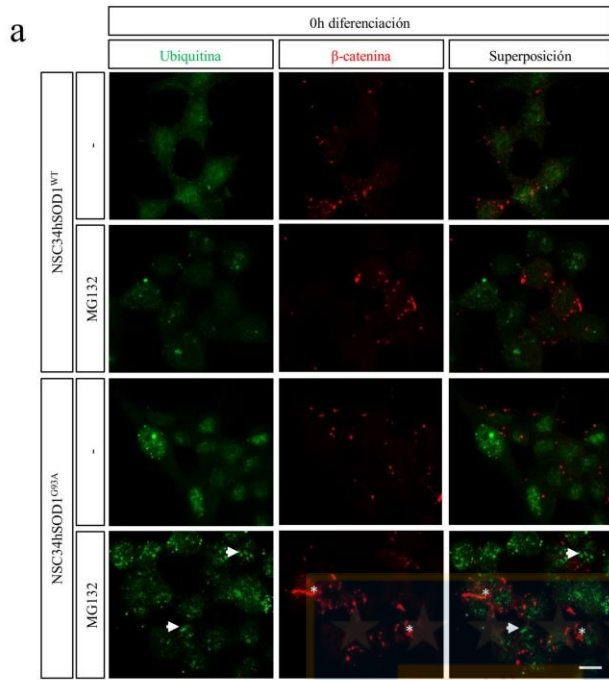
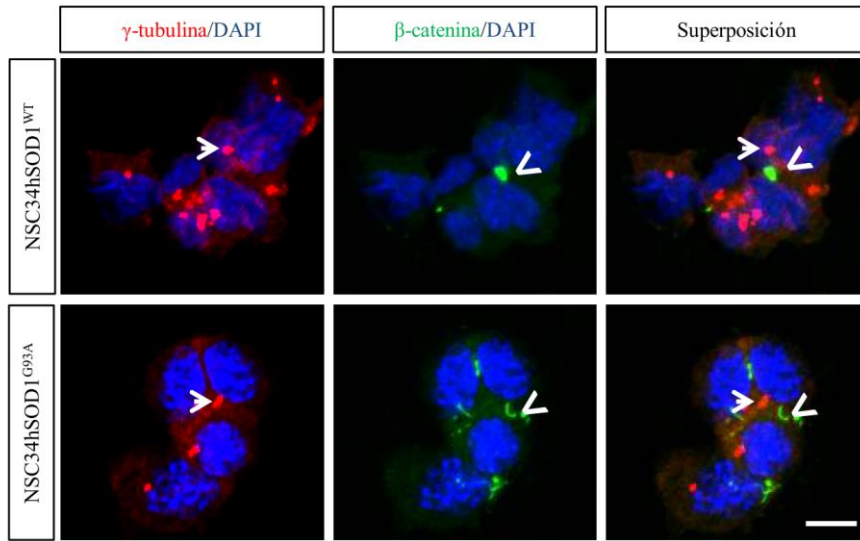


Figura 7. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a agregados de Ubiquitina en células NSC34hSOD1.

a) Células NSC34hSOD1 indiferenciadas fueron tratadas con MG132 10 μ M durante 6h para inducir la formación de agregados de proteínas. Posteriormente las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo de conejo anti ubiquitina (verde, panel izquierdo) y un anticuerpo de ratón anti β -catenina (rojo, panel central). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de conejo acoplado a CyTM2 y anti-IgG de ratón acoplado a CyTM3. Se observa el desarrollo de agregados de ubiquitina (flechas), y estructuras de β -catenina (asteriscos) no superpuestas en células NSC34hSOD1^{G93A}. b) Reconstrucción 3D de los planos de imágenes obtenidas por microscopía confocal. Se muestran células NSC34hSOD1^{G93A} con agregados positivos para ubiquitina (verde) y β -catenina (rojo) no superpuestas. Barra 10 μ m c) En el panel derecho se muestran los ejes x, y y z, mostrando la orientación la orientación de la reconstrucción 3D. Barra= 10 μ m. Fuente: Elaboración propia.

a



b

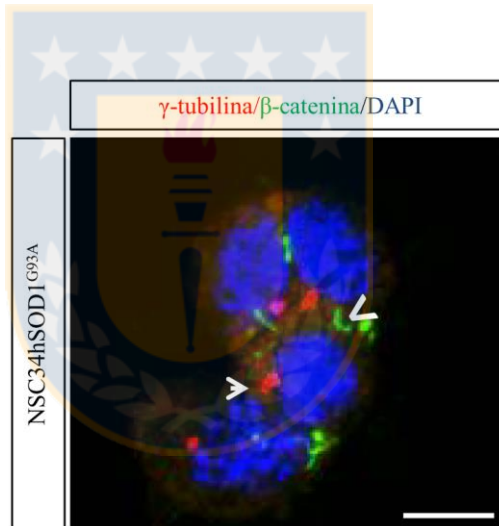
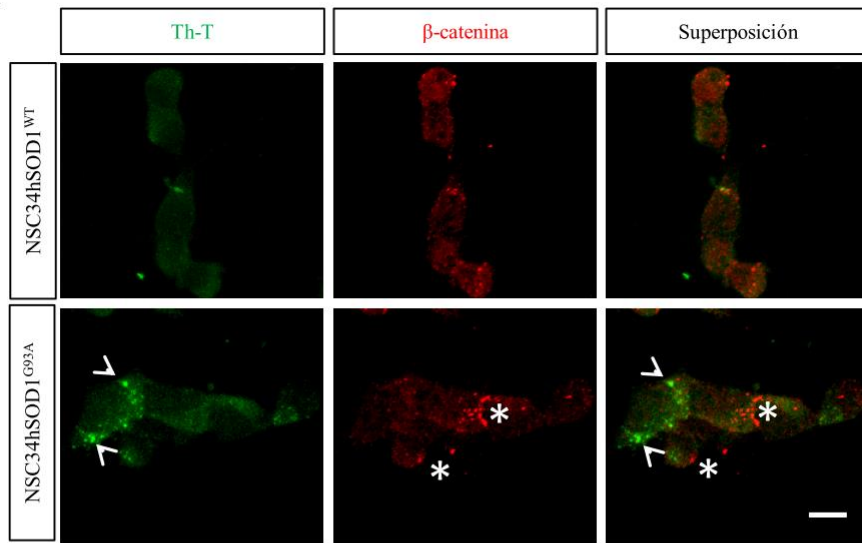


Figura 8. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a γ -tubulina en células NSC34hSOD1.

a) Células NSC34hSOD1 fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo de ratón anti- γ -tubulina (rojo, panel izquierdo) y un anticuerpo de conejo anti β -catenina (verde, panel central). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de ratón acoplado a CyTM3 y anti-IgG de conejo acoplado a CyTM2. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se observa la localización de γ -tubulina (flecha) y β -catenina (cabeza de flecha) no superpuestas en células NSC34hSOD1^{G93A}. b) Magnificación realizada en células NSC34hSOD1^{G93A}. Barra 10 μ m. Fuente: Elaboración propia.



a



b

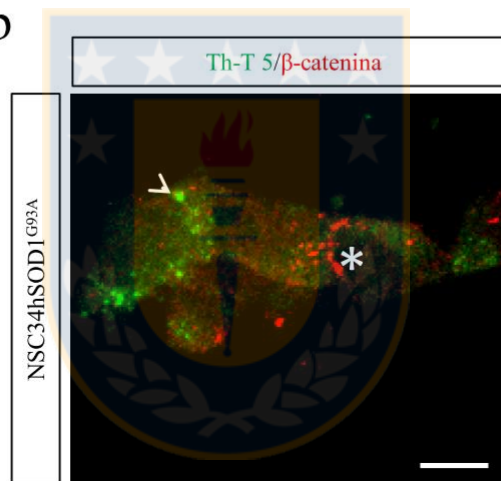


Figura 9. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a agregados amiloides en células NSC34hSOD1.

a) Células NSC34hSOD1 indiferenciadas fueron teñidas con Tioflavina T (Th-T) 5 μ M durante 24h como marcador de estructuras amiloides (verde, panel izquierdo). Posteriormente las células fueron fijadas e inmunomarcadas con un anticuerpo de ratón anti β -catenina (rojo, panel central). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón acoplado a CyTM3. Se observa la localización de Th-T (cabeza de flecha) y β -catenina (asteriscos) no superpuestas en células NSC34hSOD1^{G93A}. b) Magnificación realizada en células NSC34hSOD1^{G93A}. Barra= 10 μ m a), 20 μ m b). Fuente: Elaboración propia.



utilizado como marcador de estructuras amiloides (Elghetany & Saleem 1988), utilizando DMSO como control. Posteriormente, se realizó un marcaje inmunofluorescente utilizando un anticuerpo anti- β -catenina. Los resultados muestran que las células NSC34hSOD1^{G93A} desarrollan estructuras positivas a la tinción con Tioflavina T, en comparación a las células NSC34hSOD1^{WT} (Fig. 9a). Al analizar la superposición de las marcas, las estructuras de β -catenina no colocalizan con la tinción con Tioflavina T (Fig. 9a, panel derecho). Estos resultados sugieren la formación de estructuras amiloides en células que expresan hSOD1^{G93A}. Por otra parte, ellos indican que las estructuras de β -catenina no corresponden a agregados de tipo amiloide.

5.3.1.4 Estudio de localización de β -catenina respecto a gránulos de stress en células NSC34hSOD1.

Los gránulos de estrés son estructuras transitorias producidas en condiciones de stress para reprogramar la traducción de proteínas. En ellos se acumulan ARNm y proteínas como factores iniciadores de la traducción (Buchan & Parker 2009, Chen & Liu 2017). Considerando que las estructuras de β -catenina no se han localizado en agregados insolubles, es posible que estén constituyendo agregados organizados de manera transitoria.

Para determinar si las estructuras de β -catenina se encuentra formando parte de gránulos de stress, las células NSC34hSOD1 fueron inducidas a una condición de stress mediante el tratamiento con arsenito de sodio

(NaAsO₂) (Tourrière et al 2003). La presencia de gránulos de stress fue detectada mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-TIA-1 y anti eIF3 α , los cuales deben co-localizar en los mismos gránulos para ser considerados como tales. Adicionalmente, estos cultivos fueron analizados con un anticuerpo anti- β -catenina. Los resultados muestran que el tratamiento con arsenito de sodio, induce la formación de estructuras doblemente positivas para TIA-1 y eIF3 α en ambas líneas celulares (Fig. 10), indicando la formación de gránulos de estrés en el modelo in vitro de ELA. Estos resultados sugieren además que la expresión de la mutación hSOD1^{G93A} presenta una mayor susceptibilidad a una condición de estrés.

En relación a la distribución de los gránulos de estrés y las estructuras de β -catenina, se puede observar que las estructuras de β -catenina no co-localizan con la marca combinada para las proteínas TIA-1 y eIF3 α . Por lo tanto, β -catenina no se encuentra formando parte de gránulos de stress.

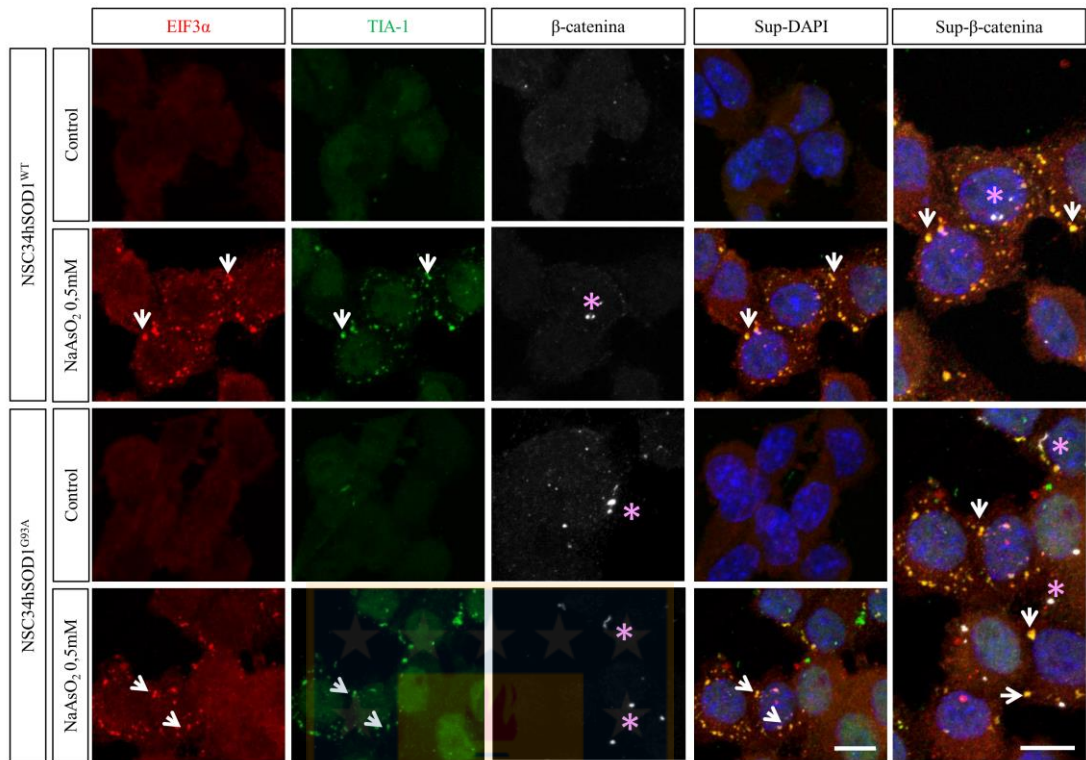


Figura 10. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a gránulos de estrés en células NSC34hSOD1.

Células NSC34hSOD1 indiferenciadas fueron tratadas con arsenito de sodio 0,5 mM por 45 min. Posteriormente las células fueron teñidas con un anticuerpo de conejo anti eIF3 α (rojo, panel izquierdo) además de un anticuerpo de cabra anti TIA-1 (verde, panel medio) y un anticuerpo de ratón anti β -catenina (blanco, panel derecho). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-IgG de conejo acoplado a Alexa-Fluor 546, anti-IgG de cabra acoplado a Alexa-Fluor 488 y anti-IgG de ratón acoplado a CyTM5. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se observa que el tratamiento con arsenito de sodio induce la formación de gránulos de estrés (flechas) en ambas líneas celulares NSC34hSOD1; sin embargo, estas no colocalizan con las estructuras de β -catenina (asteriscos, panel derecho). Barra= 10 μ m.

Fuente: Elaboración propia.

En su conjunto, los presentes resultados conforman una primera etapa en la determinación de la naturaleza de las estructuras de β -catenina presentes en el modelo tanto in vivo como in vitro de ELA. Las observaciones permiten descartar la distribución de β -catenina en agregados intracelulares, como agregados de hSOD1 mutada, agregados ubiquitinados, agresomas, agregados amiloideos o gránulos de estrés. Por lo tanto, las estructuras de β -catenina no se encontrarían formando parte de estructuras proteicas insolubles.

La presencia de las estructuras de β -catenina de manera más frecuente en grupos celulares, en comparación a células aisladas que expresan hSOD1^{G93A} (Pinto et al 2013), podrían conformar un indicio de la localización de las estructuras de β -catenina en puntos de contactos célula-célula.

5.3.2 Estudio de localización de β -catenina respecto a proteínas de unión intercelulares en células NSC34hSOD1.

Las uniones intercelulares mantienen la integridad de los tejidos. Se han descrito tres sistemas de unión intercelular: las uniones ocluyentes, esenciales para establecer la barrera epitelial; las uniones comunicantes, los cuales sirven como canales para la transferencia de iones y moléculas pequeñas; y las uniones adherentes, las cuales se asocian con citoesqueleto de actina y mantienen las propiedades adhesivas de la célula (Green et al 2010, Tian et al 2011). La proteína β -catenina participa tanto en la activación

transcripcional de la vía Wnt como en la adhesión intercelular mediada por cadherinas, en uniones adherentes (Heuberger & Birchmeier 2010, Peifer & Polakis 2000). Por otra parte, se ha descrito que conexina 43 y β -catenina colocalizan en la membrana plasmática de progenitores neurales humanos derivados de neurósferas (Rinaldi et al 2015). Debido a la participación de β -catenina en ambos tipos de interacción célula-célula, en este trabajo de tesis se estudiará su distribución respecto a las proteínas E-cadherina, N-cadherina y conexina 43.

5.3.2.1 Estudio de localización de β -catenina respecto a E-cadherina en células NSC34hSOD1.

La proteína β -catenina además de sus funciones junto a los factores de transcripción TCF/LEF, tiene funciones en uniones célula-célula, donde β -catenina forma un enlace entre α -catenina y cadherina, mientras que α -catenina se une al citoesqueleto de actina (Heuberger & Birchmeier 2010). Se ha descrito que E-cadherina es expresada en tejido epitelial para la mantención de la adhesión célula-célula (Van Roy & Berx 2008). Más aun, se ha descrito que la expresión de E-cadherina mantiene a β -catenina en los complejos de unión, limitando su función transcripcional (Heuberger & Birchmeier 2010). Si bien el origen de la línea celular NSC34 es neuronal (Cashman et al 1992), la fusión con células de neuroblastoma y la condición de cultivo in vitro podrían otorgar características epiteliales a las líneas NSC34hSOD1 (Heuberger & Birchmeier 2010).

Para determinar si β -catenina se encuentra en complejos de unión con E-cadherina, se analizaron células NSC34hSOD1 mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti- β -catenina y anti-E-cadherina. Los resultados muestran que E-cadherina se distribuye en puntos tanto citoplasmáticos como de membrana en ambas líneas celulares, presentándose de forma más abundante y de mayor tamaño en células NSC34hSOD1^{G93A} (Fig. 11A). Al analizar la superposición de la fluorescencia de E-cadherina y las estructuras de β -catenina, es posible distinguir que se distribuyen de manera independiente una de la otra. Por lo tanto las estructuras de β -catenina no se encuentran asociadas a uniones adherentes formadas por E-cadherina.

En forma similar, para estudiar si β -catenina se encuentra en complejos de unión con N-cadherina, se analizaron células NSC34hSOD1 mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti- β -catenina y anti-N-cadherina. La figura 11B muestra que N-cadherina se distribuye en pocos puntos en los espacios intercelulares, no observándose diferencias evidentes en el patrón de distribución entre los dos tipos celulares NSC34hSOD1 (Fig. 11B). Al analizar la superposición de la fluorescencia de N-cadherina y de las estructuras de β -catenina, puede observarse que, salvo algunos puntos de co-distribución de la marca, las estructuras de β -catenina en general no se encuentran asociadas a uniones adherentes formadas por N-cadherina.

5.3.2.2 Análisis de la adhesión célula-célula en células NSC34hSOD1.

Considerando que las estructuras de β -catenina se encuentran de manera preferente en límites célula-célula en grupos celulares, a continuación se evaluó si la función de las estructuras de β -catenina presentes en el modelo de ELA podría relacionarse con su función en adhesión celular. Para llevar a cabo ensayos de adhesión célula-célula, células NSC34hSOD1 fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 12mm de diámetro durante 4 días hasta que el cultivo adquiriera una confluencia cercana al 100%. En forma paralela, se cultivaron ambas líneas celulares sobre una superficie de plástico hasta lograr una confluencia de un 80%, las cuales fueron marcadas con el trazador intracelular calceína-AM asociada al fluoróforo Alexa-488. Luego de la tinción, las células fueron tripsinizadas y sembradas en iguales cantidades sobre los cultivos confluentes de la misma línea celular durante 30min y 1h a 37°C y se cuantificó el número de células fluorescentes adheridas a la monocapa celular. Los resultados muestran que el número de células NSC34hSOD1^{WT} adheridas a la monocapa incrementan en el tiempo, mientras que el número de células NSC34hSOD1^{G93A} se mantiene constante y es significativamente menor que el de las células NSC34hSOD1^{WT} a 1h de incubación (hSOD1^{WT} 1h: $7,7 \pm 1,8$ cels/10000 μm^2 ; hSOD1^{G93A} 1h: $3,1 \pm 0,6$ cels/10000 μm^2) (Figura 11c).

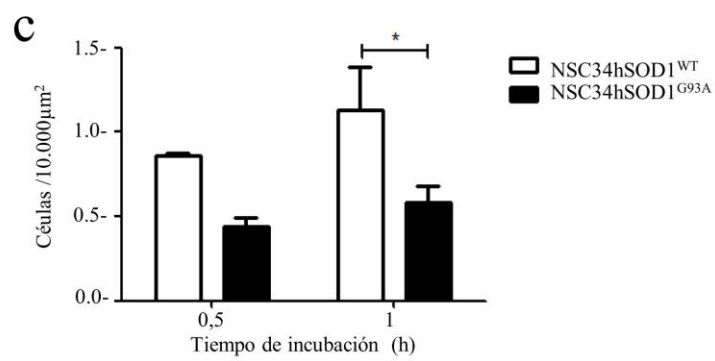
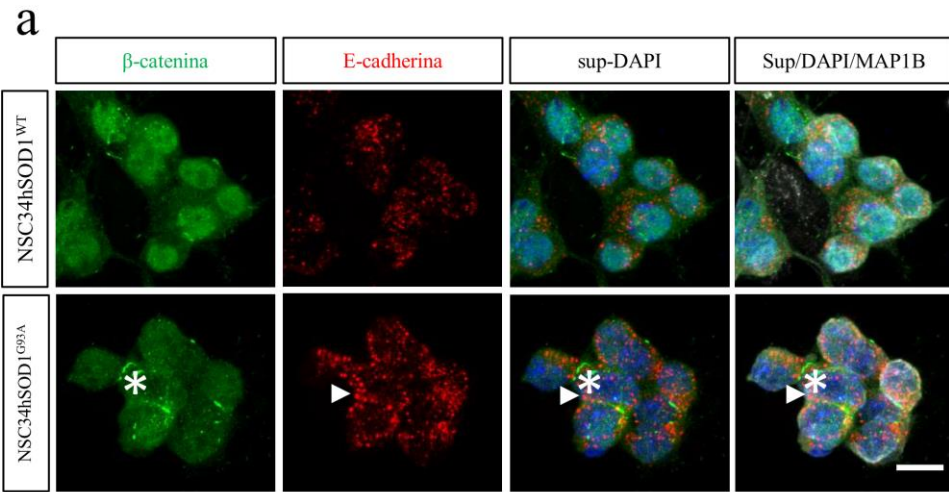


Figura 11. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a uniones adherentes en células NSC34hSOD1.

a) Células NSC34hSOD1 fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo de ratón anti- β -catenina (verde panel izquierdo), un anticuerpo de conejo anti E-cadherina (rojo, panel medio) y un anticuerpo de cabra anti-MAP1B (blanco, panel derecho). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de ratón acoplado a CyTM2, anti-IgG de conejo acoplado a CyTM3 y anti IgG de cabra acoplado a CyTM5. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se observa la distribución punteada de E-cadherina (flecha) en ambas líneas celulares NSC34hSOD1, siendo más abundantes en células NSC34hSOD1^{G93A}. Las estructuras de β -catenina (asterisco) no se superponen con E-cadherina. Barra= 10 μ m. b) Células NSC34hSOD1 fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo de ratón anti- β -catenina (rojo panel medio), un anticuerpo de conejo anti N-cadherina (verde, panel izquierdo). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de ratón acoplado a CyTM3 y anti-IgG de conejo acoplado a CyTM2. Los núcleos fueron teñidos con Topro-3. Se observa la distribución punteada de N-cadherina (asterisco) en ambas líneas celulares NSC34hSOD1, siendo escasa en células NSC34hSOD1^{G93A}. Las estructuras de β -catenina no se superponen con la tinción para N-cadherina. Barra= 10 μ m. c) Células NSC34hSOD1 fueron cultivadas a una confluencia de un 100%. Sobre las células en monocapa fueron sembradas células pertenecientes a la misma línea celular, las que fueron previamente marcadas mediante tinción vital con Alexa488-Calceina-AM. Las células fueron incubadas a 37°C durante 0,5 y 1h. Posteriormente las células fueron

fijadas y montadas. El gráfico muestra la cuantificación de la adhesión célula-célula expresado como número de células en μm^2 . Los valores corresponden al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (** $p < 0,01$; ANOVA One-way, post test Bonferroni). Fuente: Elaboración propia.



5.3.2.3 Estudio de acoplamiento celular y expresión de Conexina 43 en células NSC34hSOD1

Se ha descrito que Conexina 43 y β -catenina colocalizan en la membrana plasmática de progenitores neurales humanos derivados de neurósferas (Rinaldi et al 2015). Como una aproximación funcional para determinar si las células NSC34hSOD1 presentan uniones comunicantes, se realizaron experimentos de acoplamiento celular. En cultivos de células NSC34hSOD1 se seleccionaron, para cada tipo celular, grupos de más de 6 células, donde una célula por grupo fue inyectada con el trazador amarillo lucifer. Para corroborar la posible transferencia del trazador a las células vecinas, se inyectó además el trazador neurobiotina, el cual fue analizado posteriormente por medio de la incubación con estreptavidina Cy3. Los cultivos fueron incubados durante dos minutos post-microinyección para observar la posible difusión del amarillo lucifer a las células adyacentes. El porcentaje de grupos celulares que presentan acoplamiento fue cuantificado, para cada línea celular. Los resultados muestran que el trazador difundió a las células vecinas en la línea celular NSC3hSOD1^{G93A} (Fig. 12a) de forma más frecuente que en células NSC3hSOD1^{WT}. Esta transferencia fue corroborada a través de la observación de neurobiotina (Fig. 12a). La cuantificación de la incidencia de acoplamiento muestra un incremento significativo en células NSC3hSOD1^{G93A} en comparación a las células control (Fig. 12b) (hSOD1^{WT}: 6,948±1,8%; hSOD1^{G93A}:

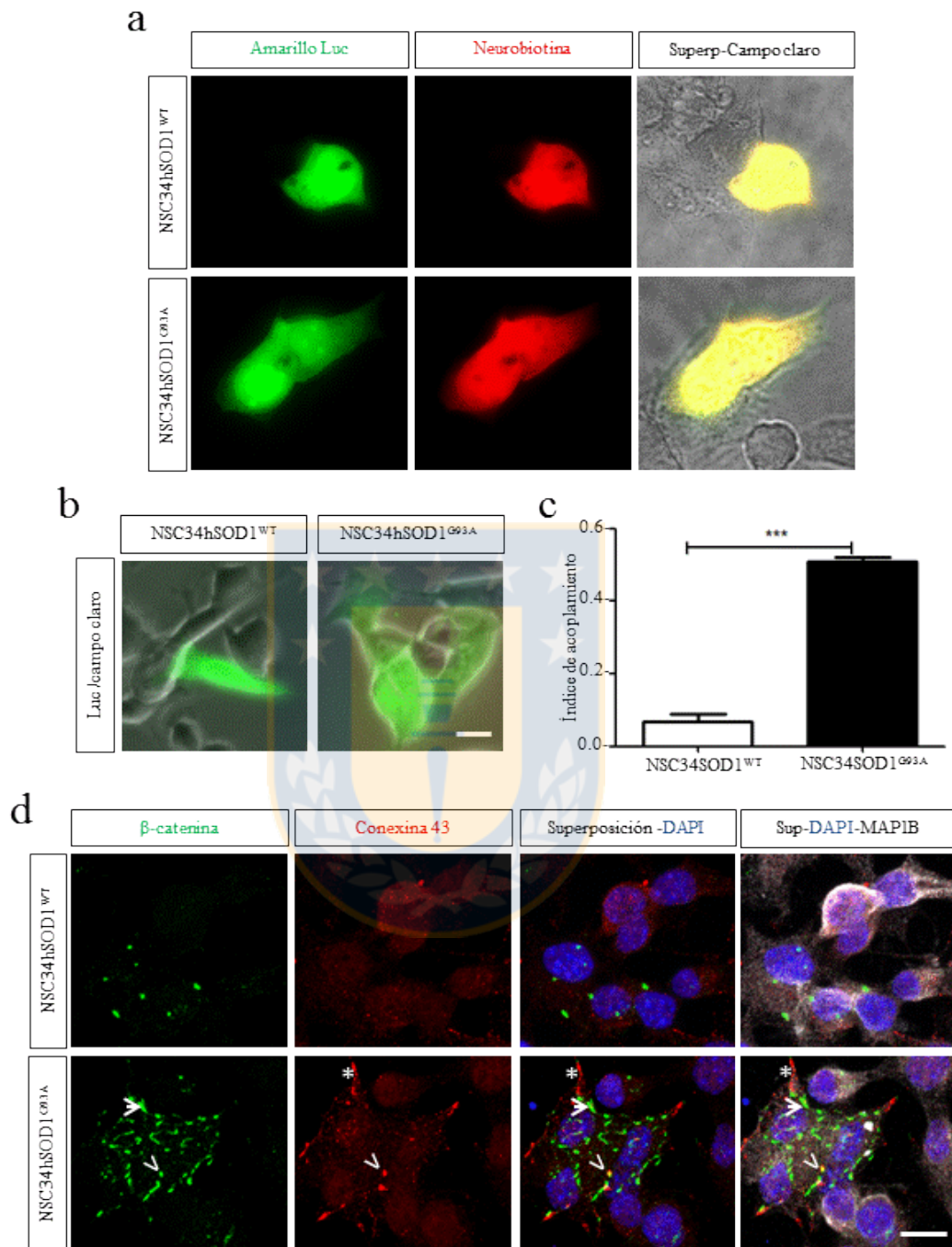


Figura 12. Distribución de estructuras de β -catenina respecto a conexina 43 y estado funcional de hemicanales en células NSC34hSOD1.

a) Células NSC34hSOD1 fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo de ratón β -catenina (verde panel izquierdo), un anticuerpo de conejo anti Conexina 43 (rojo, panel medio) y un anticuerpo de cabra anti-MAP1B. Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de ratón acoplado a CyTM2, anti-IgG de conejo acoplado a CyTM3 y anti IgG de cabra acoplado a CyTM5. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se observa que las marcas de β -catenina (flecha) y conexina 43 (asterisco) se distribuyen de forma independiente y colocalizan en escasos puntos (cabeza de flecha) en células NSC34hSOD1^{G93A}. Barra= 10 μ m. b) Células NSC34hSOD1 fueron inyectadas con los trazadores amarillo de lucifer (verde, panel izquierdo) y neurobiotina, la que fue revelada con streptavidina Cy3 (rojo, panel medio). La difusión de amarillo de lucifer fue analizada luego de dos minutos de incubación. En c) y d) se cuantificó el porcentaje de grupos celulares en los cuales se evidenció la transferencia del trazador a una o más células. El gráfico muestra un incremento significativo del porcentaje de grupos celulares que presentan acoplamiento en células NSC34hSDO1^{G93A}. Los datos fueron expresados como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (***) $p < 0,001$; test t pareado). Fuente: Elaboración propia.

49,02±0,9%, ***p<0,001, test t pareado), indicando el incremento de uniones comunicantes en células que expresan la mutación G93A en hSOD1.

Para determinar si β -catenina se encuentra en uniones comunicantes en células NSC34hSOD1, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica con anticuerpos anti β -catenina y anti conexina-43. Los resultados muestran que en ambas líneas celulares, conexina-43 muestra una distribución punteada tanto en el citoplasma como asociados a la membrana plasmática (Fig. 12c). Al analizar la superposición de la distribución de ambas proteínas, es posible distinguir que β -catenina no presenta co-localización con conexina 43. En su conjunto, nuestros resultados muestran que, aun cuando las células NSC34hSOD1^{G93A} muestran un incremento de uniones comunicantes, las estructuras de β -catenina no co-localizan con conexina-43.

5.4 Estudio de la función de las estructuras de β -catenina en el modelo in vitro de ELA dado por las células NSC34hSOD1.

En modelos in vivo e in vitro de la EA, se ha descrito tanto la disminución de los niveles totales de β -catenina como de su capacidad para translocar al núcleo (Zheng 1998 (Almeida et al 2005, De Ferrari et al 2003, Nishimura et al 1999). En estos modelos, la activación de la vía Wnt canónica resulta en neuroprotección, recuperando la viabilidad y manteniendo la morfología de

los procesos neuronales. Por otra parte, en un modelo in vitro de la EH, se ha demostrado que la estabilización de β -catenina fosforilada no disponible para la activación transcripcional tiene efectos tóxicos para las neuronas (Godin et al 2010). En este modelo, la expresión de una proteína que incrementa la degradación de β -catenina y reduce su acumulación, tiene efectos neuroprotectores frente a la expresión de huntingtina poliglutaminada (Godin et al 2010). Por lo tanto, la búsqueda de mecanismos que permitan la movilización de β -catenina, podría mostrar indicios de la posible función que tienen estas estructuras, así como su posible naturaleza.

Para determinar si las estructuras de β -catenina participa de funciones celulares en la línea celular NSC34hSOD1^{G93A}, se realizó el análisis tanto la distribución de las estructuras de β -catenina como parámetros morfológicos de diferenciación en condiciones de activación de la vía de señalización Wnt. Para ello se realizaron ensayos farmacológicos con dos drogas inhibidoras de GSK3 β . Como una primera aproximación se realizaron ensayos farmacológicos con LiCl (De Ferrari et al 2003), el cual se ha descrito como un inhibidor de GSK3 β , entre otros diversos mecanismos (Camins et al 2009, Quiroz et al 2010, Young 2009). Además, se utilizó la droga Andrografólido (ANDRO), un inhibidor de GSK3 β de características no competitivas con ATP, que no altera el comportamiento de otras quinasas, describiéndose como un activador específico de la vía de señalización Wnt (Tapia-Rojas et al 2015).

5.4.1 La activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina induce el desensamble de las estructuras de β -catenina en el modelo in vitro de ELA.

Para determinar si la activación de la vía de señalización Wnt induce cambios en la distribución de las estructuras de β -catenina, células NSC4hSOD1^{G93A} fueron tratadas por 6h con LiCl 40mM (De Ferrari et al 2003) o ANDRO 10 μ M (Tapia-Rojas et al 2015) utilizando PBS y DMSO como control, respectivamente. Los cultivos fueron fijados y analizados mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti- β -catenina y un anticuerpo anti-MAP1B. Los núcleos fueron evidenciados utilizando el marcador nuclear DAPI. Los resultados muestran que el tratamiento con LiCl resulta en una reducción del número de estructuras de β -catenina por célula, en comparación al tratamiento control con el tampón PBS (PBS1X: $2,9 \pm 0,48$; LiCl: $1,2 \pm 0,10$; * $p < 0,05$, test t pareado) (Fig. 13a, 13b). Por otra parte, la cuantificación del tamaño de las estructuras de β -catenina muestra una disminución significativa del área promedio en células NSC34hSOD1^{G93A} tratadas con LiCl (PBS1X: $0,61 \pm 0,007 \mu\text{m}^2$; LiCl: $0,45 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$; * $p < 0,05$, test t pareado) (Fig. 13c).

Para determinar qué intervalos de área presentan las estructuras de β -catenina tratadas con LiCl para contribuir a la disminución del área promedio en células NSC34hSOD1^{G93A}, se realizó un histograma de distribución en distintos intervalos de áreas, en el que se puede observar que el tratamiento

con LiCl induce una disminución significativa en el porcentaje de estructuras de β -catenina con áreas mayores a $1\mu\text{m}^2$ (PBS1X: $14,5\pm 2,1$; LiCl: $10,9\pm 3,2$; $*p < 0,05$ ANOVA 2-way, post-test Bonferroni). Consistentemente, dicha disminución se correlacionó con un incremento en el porcentaje de estructuras de β -catenina inferiores a $0,2\ \mu\text{m}^2$ (PBS1X: $40,5\pm 2,9$ LiCl: $41,7\pm 3,2$; $***p < 0,001$ ANOVA 2-way, post-test Bonferroni) (Fig. 13d).

De forma similar al efecto de LiCl, el tratamiento con ANDRO en células NSC34hSOD1^{G93A} redujo el número de estructuras de β -catenina por célula, en comparación al tratamiento control con DMSO (DMSO: $2,5\pm 0,2$; ANDRO: $1,1\pm 0,1$; $*p < 0,05$, test t pareado) (Fig. 14a, 14b). El análisis del área promedio de las estructuras de β -catenina muestra que el tratamiento con ANDRO disminuyó este parámetro en comparación al tratamiento con DMSO (DMSO: $0,7\pm 0,1$; ANDRO: $0,3\pm 0,04$; $*p < 0,05$, test t pareado) (Fig. 14c).

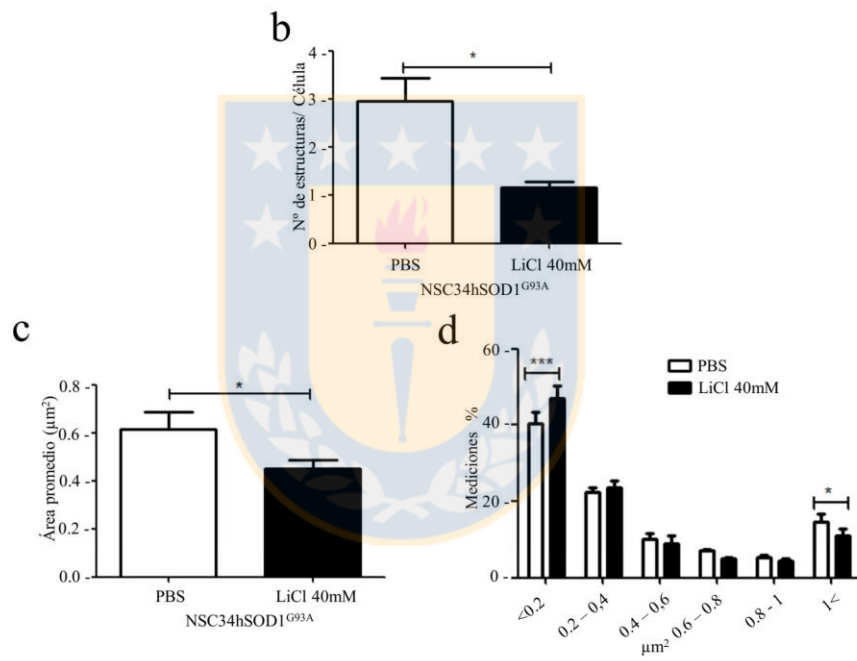
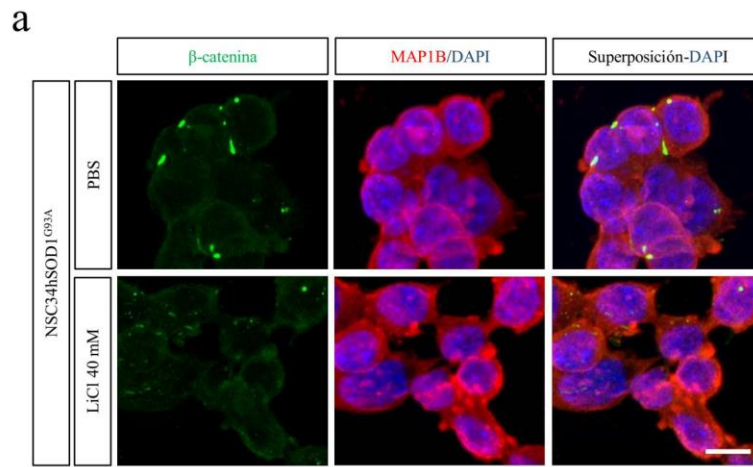


Figura 13. Efecto del tratamiento con LiCl sobre la distribución de β -catenina en células NSC34hSOD1^{G93A}.

Células NSC34hSOD1^{G93A} indiferenciadas fueron tratadas con LiCl 40mM durante 6h, utilizando PBS como control. Posteriormente las células fueron fijadas y doblemente teñidas con un anticuerpo de ratón anti- β -catenina (verde, panel izquierdo) y un anticuerpo de cabra anti-MAP1B (rojo, panel medio). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de ratón acoplado a CyTM2, anti-IgG de cabra acoplado a CyTM3. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. a) Imágenes de las células NSC34hSOD1^{G93A} tratadas con PBS (control) y tratadas con LiCl. Barra= 10 μ m. Las imágenes fueron cuantificadas con el programa ImageJ. b) Cuantificación del efecto del tratamiento con LiCl sobre la distribución de las estructuras de β -catenina expresado como número de estructuras por célula. El gráfico representa el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes (* p <0,05; test t pareado). c) Se muestra la cuantificación del efecto de LiCl sobre el área promedio de estructuras de β -catenina expresados en μ m². Se graficó el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* p <0,05; test t pareado). d) Cuantificación de la distribución de rangos de áreas de estructuras de β -catenina, expresados en porcentaje de intervalos. Los valores graficados corresponden al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* p <0,05; *** p <0,001; ANOVA 2-way, post-test Bonferroni). Fuente: Elaboración propia.

La cuantificación del porcentaje de las estructuras de β -catenina en distintos intervalos de áreas muestra que el tratamiento con ANDRO disminuyó el porcentaje de estructuras de β -catenina con áreas mayores a $1\mu\text{m}^2$ (DMSO: $18,6\pm 2,7$; ANDRO: $6,9\pm 2,4$; *** $p < 0,001$ ANOVA 2-way, post-tet Bonferroni), lo cual se correlaciona con un incremento en el porcentaje de estructuras de β -catenina inferiores a $0,2\mu\text{m}^2$ en células NSC34hSOD1^{G93A} tratadas con ANDRO (DMSO: $37,5\pm 1,6$; ANDRO: $52,3\pm 3,7$; *** $p < 0,001$ ANOVA 2-way, post-tet Bonferroni) (Fig. 14d).

En su conjunto, estos resultados indican que la activación de la vía de señalización Wnt induce el desensamble de las estructuras de β -catenina en células que expresan hSOD1^{G93A}, evidenciado por la disminución del número y tamaño de dichas estructuras.

5.4.2 La activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina induce un rescate en la diferenciación morfológica de células NSC34hSOD1^{G93A}.

Se ha descrito que modelos in vitro de ELA presentan una capacidad disminuida de diferenciación neuronal (Lee et al 2002, Pinto et al 2013). Para determinar un posible efecto de la activación de la vía de señalización Wnt sobre la diferenciación morfológica, células NSC34hSOD1 en condiciones indiferenciadas y diferenciadas por 24h fueron tratadas con LiCl a una concentración de $100\mu\text{M}$ durante 24h (De Ferrari et al 2003), utilizando PBS como control. Estas células fueron fijadas y sometidas a inmunolocalización

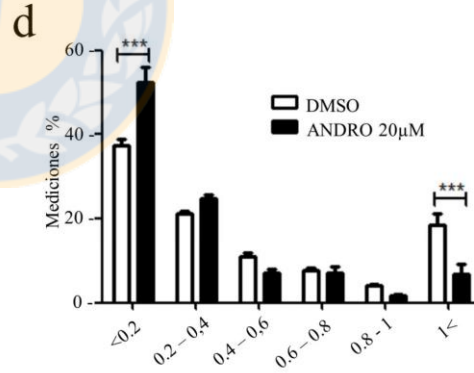
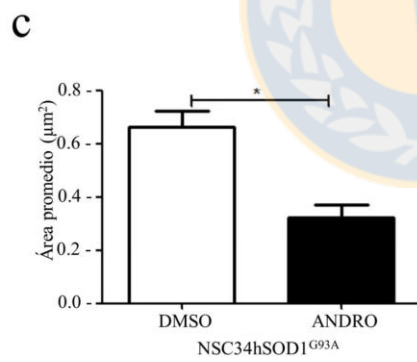
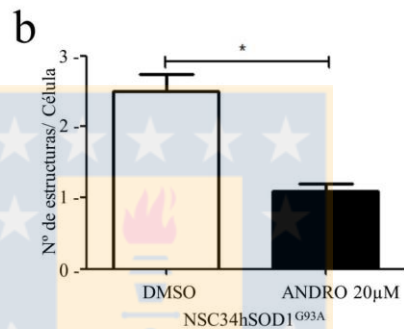
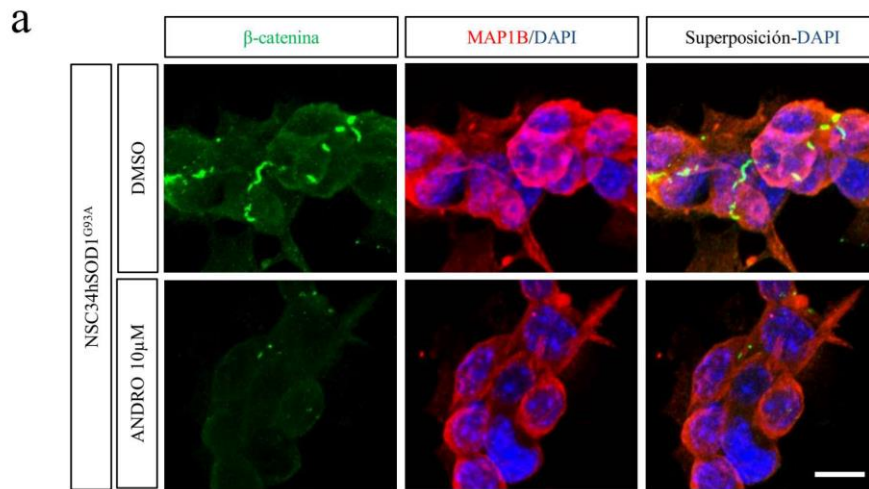


Figura 14. Efecto del tratamiento con ANDRO sobre la distribución de β -catenina en células NSC34hSOD1^{G93A}.

Células NSC34hSOD1^{G93A} indiferenciadas fueron tratadas con ANDRO 10 μ M durante 6h, utilizando DMSO como control. Posteriormente las células fueron fijadas y doblemente teñidas con un anticuerpo de ratón anti- β -catenina (verde, panel izquierdo) y un anticuerpo de cabra anti-MAP1B (rojo, panel medio). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de ratón acoplado a CyTM2, anti-IgG de cabra acoplado a CyTM3. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. a) Imágenes de las células NSC34hSOD1^{G93A} tratadas con PBS y ANDRO. Barra= 10 μ m. Las imágenes fueron cuantificadas con el programa ImageJ. b) Cuantificación del efecto del tratamiento con ANDRO sobre la distribución de las estructuras de β -catenina expresado como número de estructuras por célula. El gráfico representa el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes (* p <0,05; test t pareado). c) Se muestra la cuantificación del efecto de ANDRO sobre el área promedio de las estructuras de β -catenina, expresada en μ m². Se graficó el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (* p <0,05; test t pareado) d) Cuantificación de la distribución de rangos de áreas de estructuras, expresado como porcentaje de intervalos. El gráfico corresponde al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (** p <0,001; ANOVA 2-way, post-test Bonferroni). Fuente: Elaboración propia.

con un anticuerpo anti-MAP1B. Los resultados muestran que el tratamiento con LiCl indujo un incremento en el porcentaje de células que proyectan neuritas en células NSC34hSOD1^{WT} diferenciadas (hSOD1^{WT} 0h PBS: 5,6 ± 0,9%; hSOD1^{WT} 24h PBS: 42,0 ± 3,3%; ***p< 0,001 ANOVA One-way, post test Bonferroni). En concordancia con estudios previos (Pinto et al 2013), el porcentaje de células con neuritas en células NSC34hSOD1^{G93A} diferenciadas por 24h es significativamente menor que en células NSC34hSOD1^{WT} (hSOD1^{WT} 24h PBS: 42,0 ± 3,3%; hSOD1^{G93A} 24h PBS: 13,0 ± 0,4%; ***p<0,001 ANOVA One-way, post test Bonferroni). El tratamiento con LiCl incrementó el porcentaje de células con neuritas en la línea celular NSC34hSOD1^{G93A} en condiciones de diferenciación (NSC34hSOD1^{G93A} 24h PBS: 13,0 ± 0,4%; NSC34hSOD1^{G93A} 24h Lito: 24,2 ± 2,5%; *p< 0,05 ANOVA One-way, post test Bonferroni) (Fig. 15a, 15b). El análisis de la longitud de neuritas no muestra diferencias significativas entre las líneas celulares, ni en condiciones control (tratadas con PBS) ni frente al tratamiento con LiCl (Fig. 15C).

Para determinar si estos efectos están relacionados a la activación de la vía de señalización Wnt, las células fueron tratadas con el inhibidor ANDRO a una concentración de 10µM por 24h. Los resultados muestran que el tratamiento con ANDRO incrementó el número de células diferenciadas tanto en células NSC34hSOD1^{WT} (Fig. 16A) (hSOD1^{WT} 24h DMSO: 42,3 ± 2,0%; hSOD1^{WT} 24h ANDRO: 57,6 ± 1,8%; *p<0,05; ANOVA One-way, post test Bonferroni), como en células NSC34hSOD1^{G93A} (NSC34hSOD1^{G93A} 24h

DMSO: $22 \pm 2,4\%$; NSC34hSOD1^{G93A} 24h ANDRO: $55,9 \pm 2,3\%$). Más aun, en células NSC34hSOD1^{G93A} en condiciones de crecimiento, el tratamiento con ANDRO indujo un incremento en el porcentaje de células con neuritas (DMSO: $5,1 \pm 2,1$; NSC34hSOD1^{G93A} 0h ANDRO: $18,9 \pm 3,1$; * $p < 0,05$; ANOVA One-way, post test Bonferroni) (Fig. 16B). Por otra parte, el análisis de la longitud de neuritas no muestra diferencias significativas entre líneas celulares, ni entre las líneas con los tratamientos con PBS o ANDRO (Fig. 16C),

Estos resultados sugieren que la activación de la vía de señalización Wnt podría gatillar un programa de diferenciación neuronal, aun cuando no influye de manera significativa en la extensión de neuritas.

5.4.3 La expresión del ligando Wnt2 promueve la diferenciación morfológica en células NSC34hSOD1^{G93A}.

Se ha descrito en modelos in vitro de EA, dado por cultivos primarios de neuronas hipocampales tratados con péptido A β , que la activación de la vía canónica de señalización Wnt con el ligando Wnt3a induce la recuperación del número de células que proyectan neuritas y la longitud de estas, junto con prevenir la apoptosis neuronal (Alvarez et al 2004). Por otra parte, en médulas espinales de ratones transgénicos modelo in vivo de ELA que expresan hSOD1^{G93A}, se ha descrito un incremento significativo del ARNm de diversos ligandos Wnt, donde el ligando Wnt2 es el segundo con mayor expresión en estadios sintomáticos de la enfermedad (Yu et al 2013).

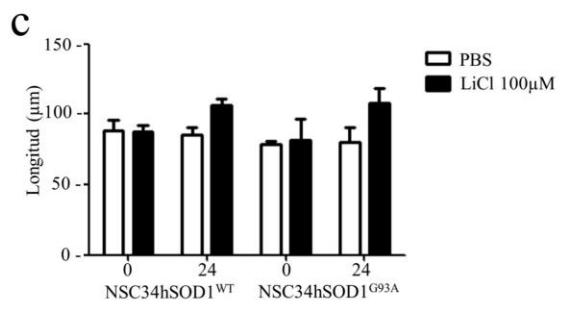
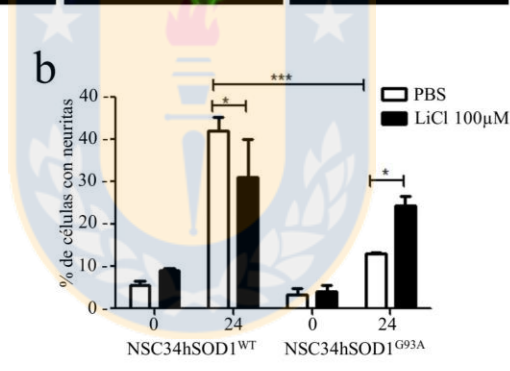
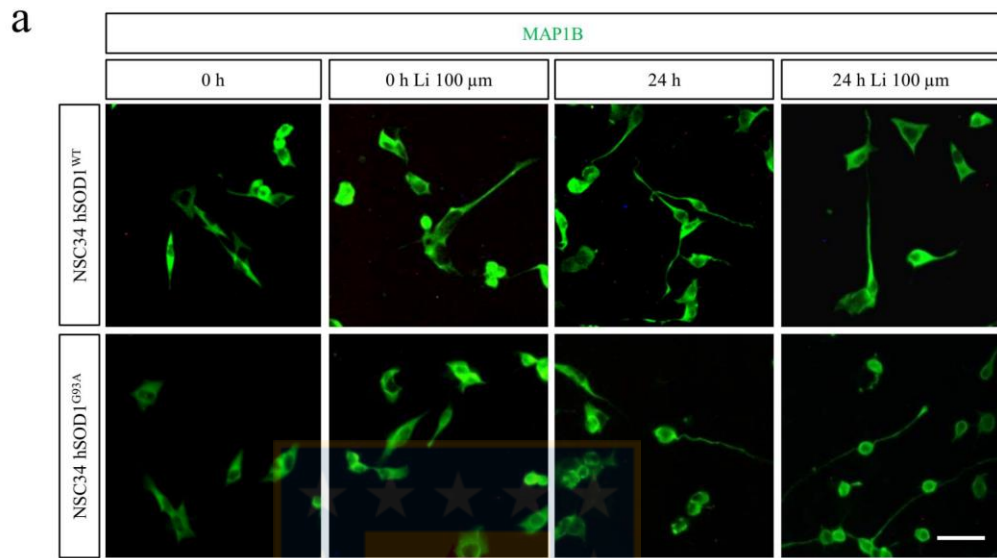


Figura 15. Efecto del tratamiento con LiCl sobre la diferenciación morfológica en células NSC34hSOD1.

Células NSC34hSOD1 fueron tratadas con LiCl 100 μ M durante 24h en condiciones indiferenciadas y diferenciadas por 24 h, utilizando PBS como control. a) Las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo de cabra anti-MAP1B. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de cabra acoplado a CyTM2. Los parámetros morfológicos fueron medidos usando ImageJ. b) Se grafica el porcentaje de células con neuritas. Los valores corresponden al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (** $p < 0,001$, * $p < 0,05$; ANOVA, post test Bonferroni). c) Se muestra la cuantificación de longitud promedio de neuritas expresada en μ m. Los valores corresponden al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (n.s.; ANOVA One-way, post test Bonferroni). Barra= 20 μ m.

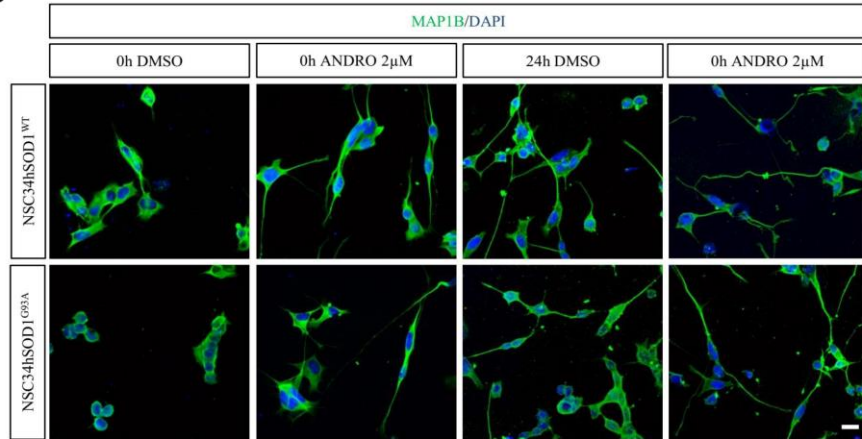
Fuente: Elaboración propia.

Para determinar el efecto de la expresión del ligando Wnt2, células NSC34hSOD1 fueron transfectadas de manera transiente con un plásmido que codifica para este ligando fusionado al tag HA y con el vector Tomato como control. Posteriormente, los cultivos transfectados se analizaron mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-HA, con el fin de visualizar las células transfectadas, y un anticuerpo anti- β -catenina. La marca nuclear fue analizada con el marcador nuclear Topro-3. Los resultados muestran que la expresión de Wnt2HA incrementa el porcentaje de células diferenciadas de la línea NSC34hSOD1^{WT} (hSOD1^{WT} Tomato: $18,1 \pm 3,6\%$; hSOD1^{WT} Wnt2-HA: $44,1 \pm 4,2\%$), y NSC34hSOD1^{G93A} (hSOD1^{G93A} TOMATE: $4 \pm 0,3$; hSOD1^{G93A} Wnt2-HA: $38 \pm 1,3$) (Fig. 17 a,b). Al analizar la longitud de neuritas, los resultados indican que las células NSC34hSOD1^{WT} y NSC34hSOD1^{G93A} positivas para el tag HA muestran una tendencia al incremento de la longitud de neuritas, en comparación con las líneas celulares transfectadas con el plasmido control (Fig. 17c).

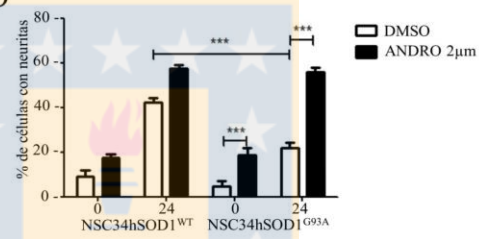
Estos antecedentes indican que el ligando Wnt2 induce un incremento en los parámetros de diferenciación morfológica, sugiriendo que la activación de la vía de señalización Wnt podría inducir el rescate de la diferenciación neuronal en ELA.

Al analizar la distribución de β -catenina en las células transfectadas, se puede observar que la expresión de Wnt2 desensambla las estructuras de β -catenina observadas en células NSC34hSOD1^{G93A} e incrementa la intensidad de β -catenina citoplasmática. Por lo tanto, en concordancia con

a



b



c

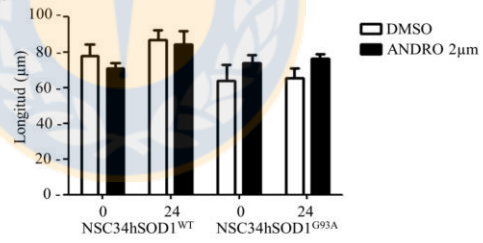
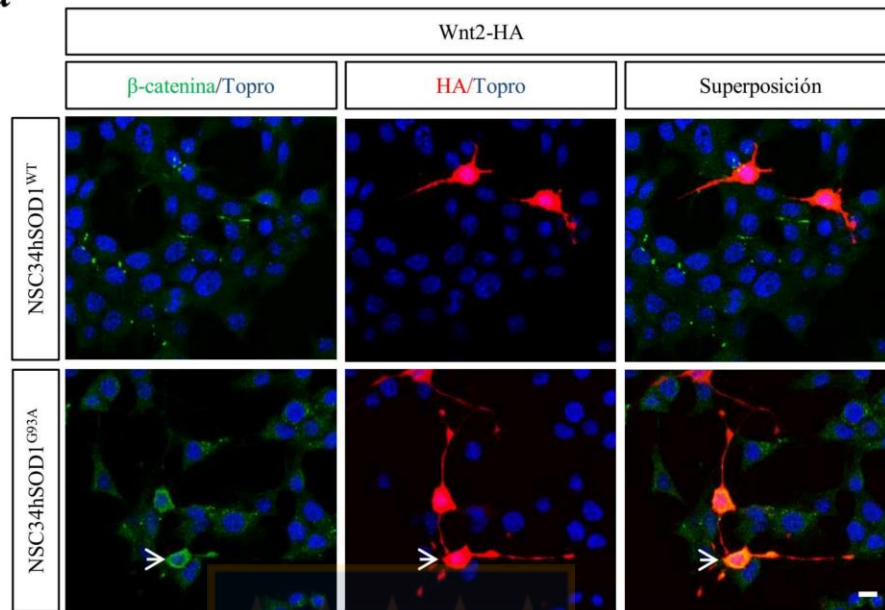


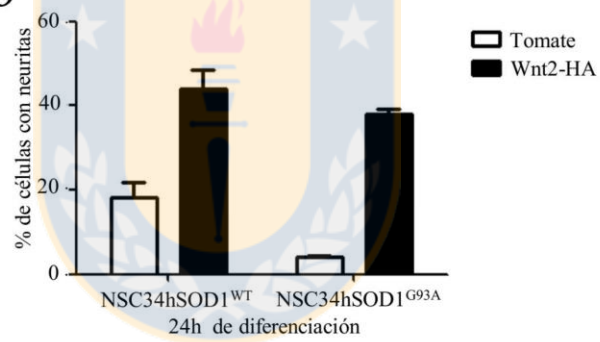
Figura 16. Efecto del tratamiento con ANDRO sobre la diferenciación morfológica en células NSC34hSOD1.

Células NSC34hSOD1 fueron tratadas con ANDRO 2 μ M durante 24h en condiciones indiferenciadas y diferenciadas por 24h, utilizando DMSO como control. a) Las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo de cabra anti-MAP1B. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de cabra acoplado a CyTM2. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Los parámetros morfológicos fueron medidos usando ImageJ. b) Se grafica el porcentaje de células con neuritas. Los valores corresponden al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (** $p < 0,001$; ANOVA One-way, post test Bonferroni). c) Se muestra la cuantificación de longitud promedio de neuritas expresada en μ m. Los valores corresponden al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes (n.s.; ANOVA One-way, post test Bonferroni) Barra= 10 μ m. Fuente: Elaboración propia.

a



b



c

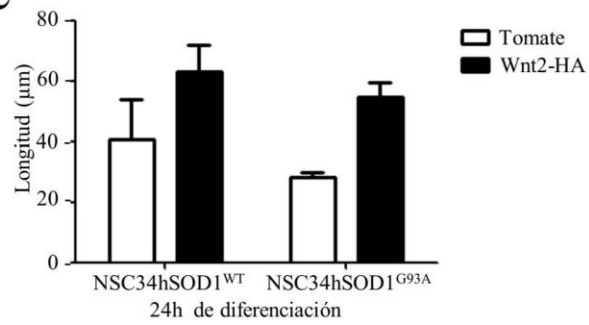


Figura 17. Efecto de la expresión del ligando Wnt2-HA sobre la diferenciación morfológica en células NSC34hSOD1.

Células NSC34hSOD1 fueron transfectadas con plásmidos que codifican para la proteína fluorescente Tomato o para Wnt2-HA. Las células fueron diferenciadas por 24 h, fijadas y teñidas con un anticuerpo de rata anti-HA (rojo, panel medio) además de un anticuerpo de conejo anti- β -catenina (verde, panel izquierdo). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de rata acoplado a CyTM3 y anti-IgG de conejo acoplado a CyTM2. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. a) Imágenes representativas de células NSC34hSOD1^{WT} y NSC34hSOD1^{G93A} transfectadas con Wnt2-HA. Barra= 10 μ m. Los parámetros morfológicos fueron medidos usando ImageJ. b) Se grafica el porcentaje de células con neuritas. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. c) Cuantificación de la longitud promedio de neuritas expresada en μ m. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. Se observa que la expresión del ligando Wnt2-HA induce un incremento en la intensidad de β -catenina citosólica (flecha) y un incremento en el porcentaje de células que proyectan neuritas.

Fuente: Elaboración propia.

Al analizar la distribución de β -catenina en las células transfectadas, se puede observar que la expresión de Wnt2 desensambla las estructuras de β -catenina observadas en células NSC34hSOD1^{G93A} e incrementa la intensidad de β -catenina citoplasmática. Por lo tanto, en concordancia con los experimentos de tratamientos farmacológicos, estos resultados indican que la activación de la vía de señalización Wnt con el ligando Wnt2 induce el desensamble de las estructuras de β -catenina.

5.5 Estudio de la vía de señalización Wnt en la unión neuromuscular de modelos in vivo de ELA.

La disfunción y pérdida sináptica es una característica temprana en modelos de enfermedades neurodegenerativas como EA (Shankar & Walsh 2009). En relación a ELA, se ha descrito que la conexión entre músculo y neurona motora se pierde en ratones que expresan hSOD1 mutada antes de la degeneración de neuronas motoras, e incluso antes de la aparición de síntomas de la enfermedad (Dupuis & Loeffler 2009, Fischer et al 2004, Frey et al 2000). En modelos de EA se ha descrito que el inhibidor de la vía Wnt canónica Dkk1 presenta un incremento en su expresión y que además es requerido para la pérdida sináptica inducida por el péptido A β (Caricasole et al 2004, Marzo et al 2016, Purro et al 2012). Por otra parte, la disminución de la expresión de Dkk1 promueve la recuperación de la estructura sináptica (Marzo et al 2016). Por lo tanto, la activación de la vía de señalización Wnt podría ser un mecanismo protector de la sinapsis (Cerpa et al 2010, Farías

et al 2009, Purro et al 2012, Purro et al 2014, Serrano et al 2014). Debido a ello, en este trabajo de tesis fue abordado el estudio de la vía de señalización Wnt en la sinapsis neuromuscular de modelos in vitro e in vivo de ELA.

5.5.1 Estudio de la localización de β -catenina en la unión neuromuscular de ratones modelo de ELA.

Se ha descrito que la ausencia de β -catenina muscular incrementa el tamaño de los agregados del AChR y reduce los potenciales de placa postsinápticos excitatorios (Li et al 2008b, Wang & Luo 2008), indicando que niveles apropiados de β -catenina son cruciales para la normal estructura y función sináptica. Para determinar posibles cambios en la localización de β -catenina, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica en cortes de crióstato de músculo gastrocnemio, provenientes de ratones que sobreexpresan hSOD1^{G93A} y control en estadios sintomáticos de la enfermedad. En cortes de orientación longitudinal a las fibras musculares, se utilizaron los anticuerpos anti-MAP1B y anti-ChAT para detectar el componente presináptico, α -bungarotoxina para marcar el componente postsináptico, y un anticuerpo anti- β -catenina. Los resultados muestran que en estadios sintomáticos (P130), en uniones neuromusculares provenientes de ratones control, β -catenina se distribuye en conjunto con el patrón del terminal axónico (Fig. 19). Sin embargo, en cortes de músculo de ratones que expresan hSOD1^{G93A}, la intensidad de la inmunotinción de β -catenina

disminuye de manera drástica, mostrando que β -catenina no se localiza en la unión neuromuscular.

Para determinar qué subpoblación de β -catenina se localiza en la unión neuromuscular, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica con un anticuerpo anti- β -catenina total en combinación con un anticuerpo anti- p- β -cateninaY654 o anti- p- β -cateninaY489 (Fig 20A). Los resultados indican que en uniones neuromusculares de músculos de ratones control la marca de ambas formas fosforiladas de β -catenina co-distribuyen con la marca postsináptica. Sin embargo, en uniones neuromusculares provenientes de ratones hSOD1^{G93A}, la localización de p- β -cateninaY654 se encuentra en porciones inervadas de agregados del AChR, mientras que la fosforilación de p- β -cateninaY489 se mantiene en estadios sintomáticos con una distribución similar al AChR, aun en ausencia del componente presináptico (Fig. 20A).

Para determinar si la fosforilación Y489 de β -catenina presenta cambios previos a la denervación observada en estadios sintomáticos, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en cortes de músculo gastrocnemio en estadios presintomáticos (P76). La distribución de la marca pre y postsináptica fue analizada mediante un anticuerpo anti-neurofilamento y α -BTX, respectivamente. En músculos control, la marca de p- β -cateninaY489 se distribuye junto a la marca de neurofilamento y α -BTX (Fig. 20B); sin embargo, en músculos provenientes de ratones que expresan hSOD1^{G93A}, la

distribución de p- β -catenina Y489 abarca un área de morfología no definida de mayor tamaño que la unión neuromuscular y muestra mayor intensidad que en músculos control. Estos resultados indican que la fosforilación Y489 de β -catenina incrementa en músculos presintomáticos de ratones modelo de ELA.

Para determinar si el patrón de distribución de β -catenina es similar en otros modelos animales de ELA; dados por mutaciones de hSOD1 distintas a G93A, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica de músculo completo utilizando el musculo lento Soleus de ratones con la mutación hSOD1^{G86R}. Para ello se utilizaron anticuerpos anti- β -catenina, anti MAP1B y α -BTX. Los resultados muestran que la marca de β -catenina total disminuye en la unión neuromuscular de ratones con la mutación hSOD1^{G86R} (Fig.21). Estos resultados sugieren que una disminución de la marca de β -catenina en la unión neuromuscular podría ser un marcador en modelos in vivo de ELA. Sin embargo, se desconoce si β -catenina asociada a estos cambios se distribuye junto al componente pre o postsináptico.

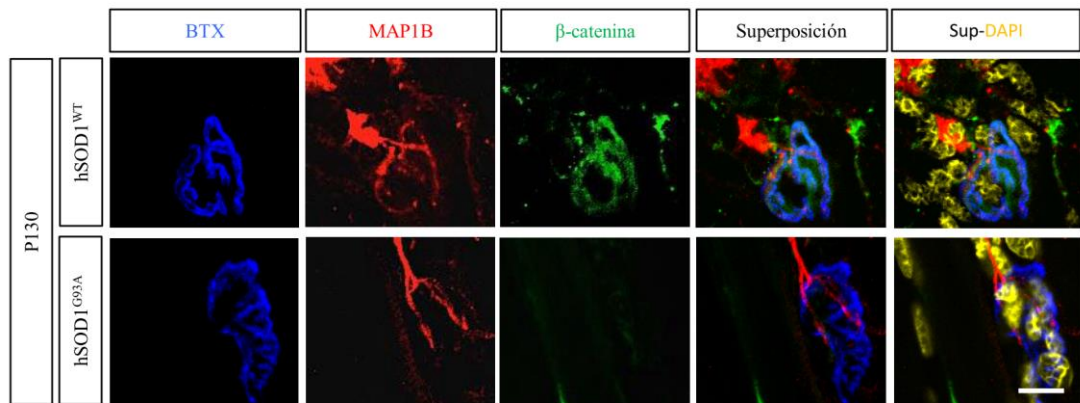


Figura 18. Distribución de β -catenina en la UNM de ratones que expresan hSOD1^{G93A}.

Músculos Gastrocnemio obtenidos de ratones que expresan hSOD1^{G93A} y ratones hSOD1^{WT} fueron crioseccionados y teñidos con un anticuerpo de cabra anti MAP1B (rojo, segunda columna) además de un anticuerpo de conejo anti- β -catenina (verde, tercera columna). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de cabra acoplado a Alexa 546 y anti-IgG de conejo acoplado a CyTM2. Los agregados del AChR fueron marcados con α -BTX acoplado a Alexa 647 (azul, primera columna). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (amarillo). Barra= 20 μ m. Fuente: Elaboración propia.

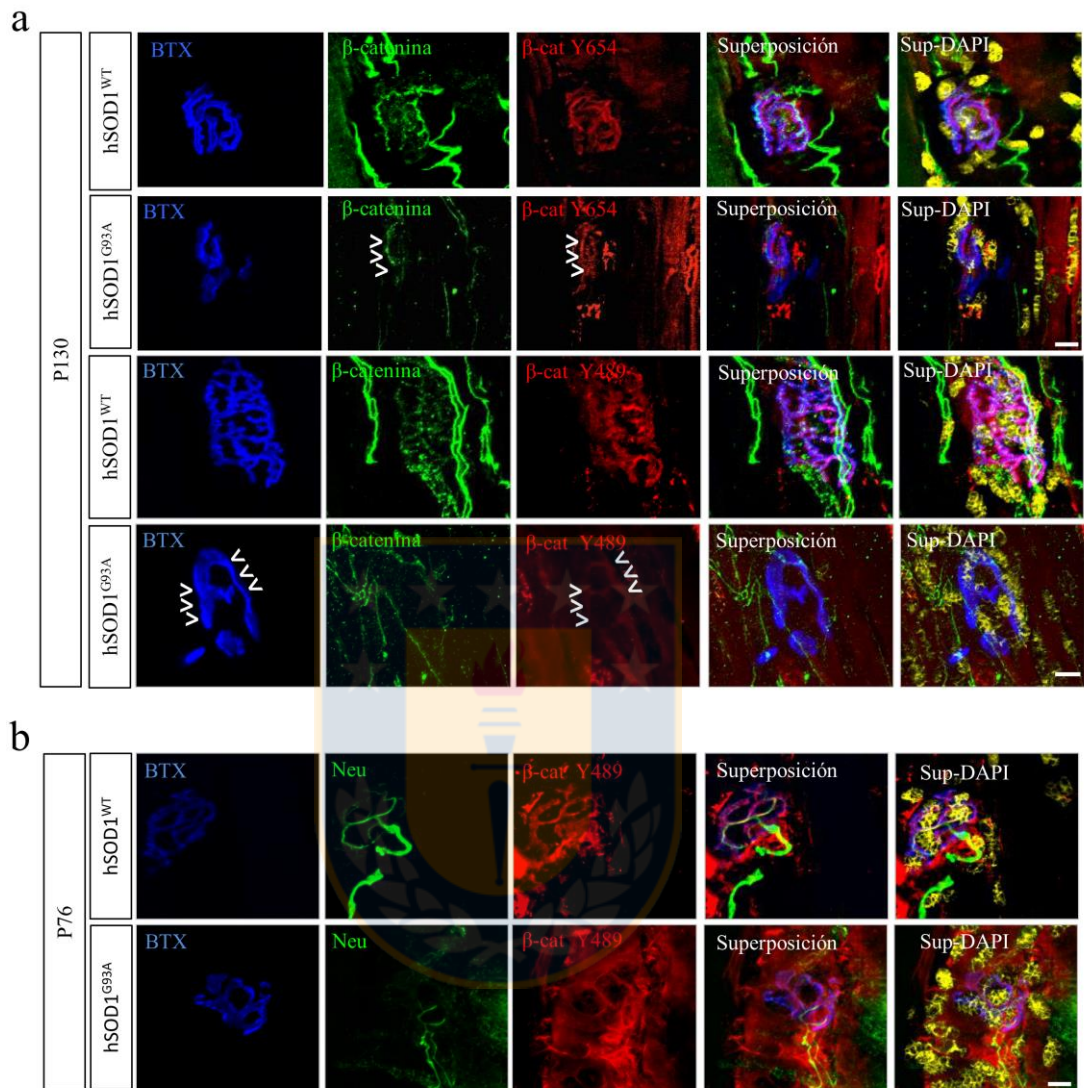


Figura 19. Estudio de la distribución de fosfo- β -catenina-Y654 y fosfo- β -catenina-Y489 en la UNM de ratones que expresan hSOD1^{G93A}.

Músculos Gastrocnemio obtenidos de ratones que expresan hSOD1^{G93A} y ratones hSOD1^{WT} fueron crioseccionados. a) En cortes provenientes de ratones en estadio sintomático (P130) se realizó la tinción con un anticuerpo de conejo anti- β -catenina (verde, segunda columna) en combinación con un anticuerpo de ratón anti-fosfo- β -catenina Y654 o anti-fosfo- β -catenina Y489 (rojo, tercera columna). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de conejo acoplado a CyTM2 y anti-IgG de ratón CyTM3. b) En criosecciones provenientes de ratones en estadio pre-sintomático (P76) se realizó la tinción con un anticuerpo de conejo anti-Neurofilamento (verde, segunda columna) y un anticuerpo de ratón anti-fosfo- β -catenina Y489 (rojo, tercera columna). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de conejo acoplado a CyTM2 y anti-IgG de ratón CyTM3. Los agregados del AChR fueron marcados con α -BTX acoplado a Alexa 647 (azul, primera columna) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (amarillo). Barra= 10 μ m. Fuente: Elaboración propia.

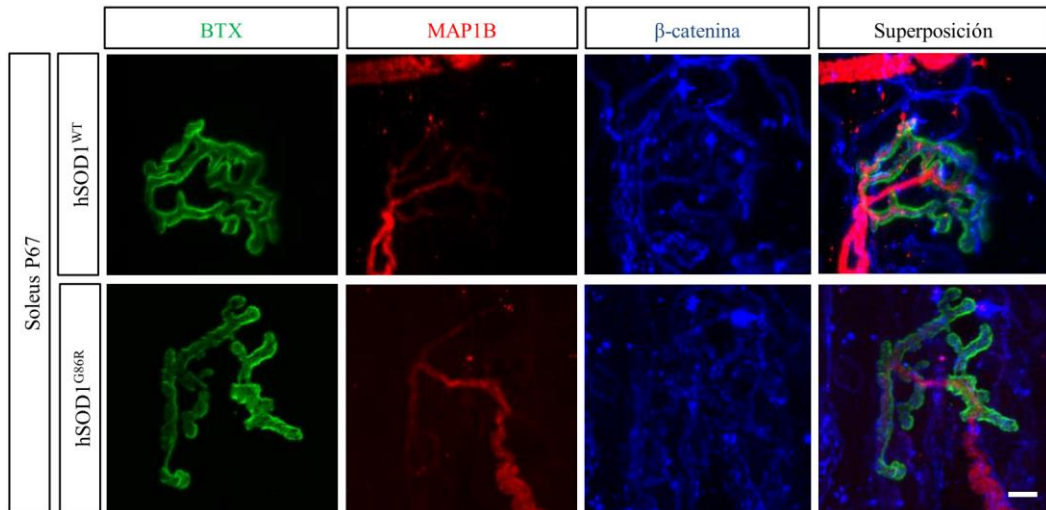


Figura 20. Distribución de β -catenina en la UNM de ratones que expresan hSOD1^{G86R}.

Se realizaron inmunofluorescencias de músculo Soleo completo obtenidos de ratones que expresan hSOD1^{G86R} y ratones WT. Se utilizó un anticuerpo de cabra anti MAP1B (rojo, segunda columna), además de un anticuerpo de conejo anti- β -catenina (azul, tercera columna). Como anticuerpos secundarios se usaron anti-IgG de cabra acoplado a Alexa 546 y anti-IgG de conejo acoplado a CyTM5. Los agregados del AChR fueron marcados con α -BTX acoplado a Alexa 488 (verde, primera columna). Barra= 10 μ m. Se observa la disminución de β -catenina en UNM de ratones modelo de ELA. Fuente: Elaboración propia.

5.5.2 Estudio de la localización de β -catenina en fibras musculares aisladas de ratones modelo ELA.

Para determinar si la localización de β -catenina se encuentra asociada al componente pre o postsináptico, se aislaron fibras musculares del músculo EDL, en las que se realizaron ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos anti- β -catenina junto α -BTX y el marcador nuclear DAPI. En estos experimentos, cada fibra muscular puede ser separada en dos regiones de estudio: un área sináptica, caracterizada por poseer el componente postsináptico, y áreas extra-sinápticas, que se extienden por el resto de la fibra. De cada fibra muscular fue cuantificado el número de núcleos por área, el número de núcleos positivos para β -catenina y la intensidad de fluorescencia de β -catenina en los núcleos.

El análisis del área extrasináptica muestra un incremento del número de núcleos totales por área en fibras musculares hSOD1^{G93A} (Control: 1,71 nuc/10.000 μ m²; hSOD1^{G93A}: 3,26 nuc/10.000 μ m²). Además, se observó un incremento del porcentaje de núcleos positivos para β -catenina, en comparación a las fibras musculares control (Control: 39,08 \pm 7,01%; hSOD1^{G93A}: 76,58 \pm 3,1%). Por otra parte, los resultados indican un incremento de la intensidad de β -catenina en los núcleos extrasinápticos de fibras musculares de ratones modelo de ELA (Control: 43,41 \pm 2,81; hSOD1^{G93A}: 70,10 \pm 1,63).

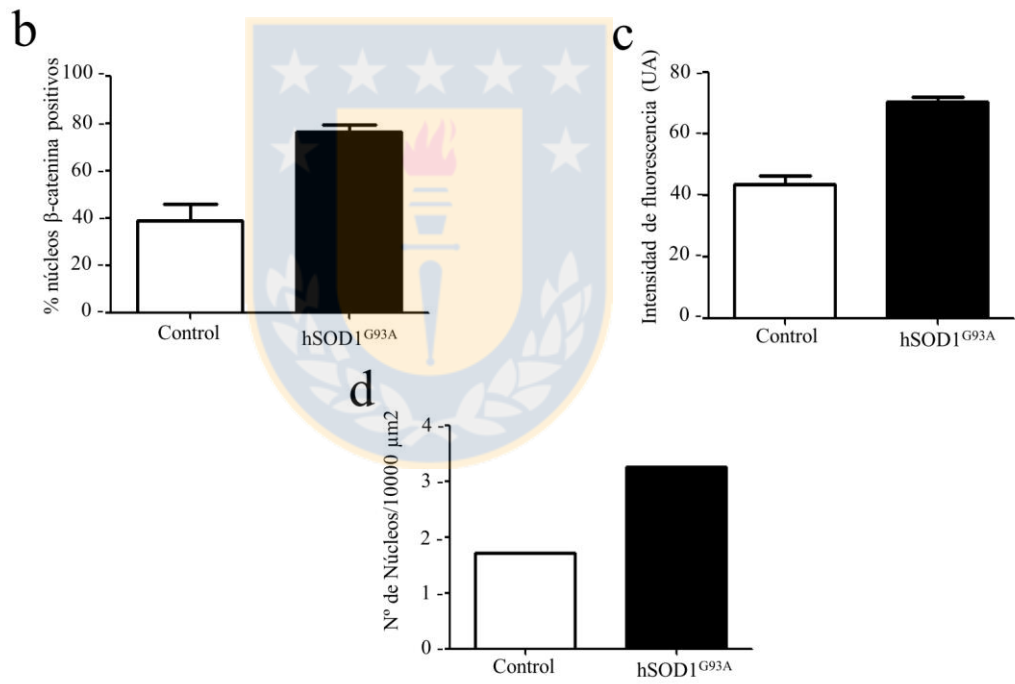
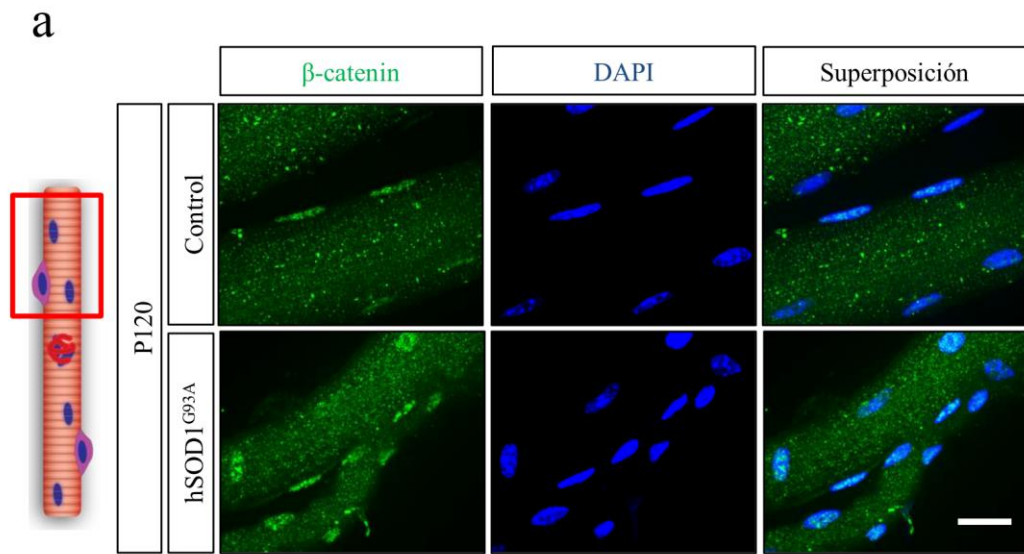


Figura 21. Estudio de la localización de β -catenina en la región extrasináptica de fibras musculares aisladas de ratones que expresan hSOD1^{G93A}.

Músculos EDL fueron disecados y disgregados para la obtención de fibras musculares aisladas de ratones que expresan hSOD1^{G93A} y control hSOD1^{WT} a) Esquema de una fibra muscular con la región extrasináptica seleccionada en rojo. El panel muestra las fibras teñidas con un anticuerpo de conejo anti- β -catenina (verde, panel izquierdo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 488. Barra 20 μ m. b) Cuantificación del porcentaje de núcleos positivos para β -catenina obtenido de 20 fibras musculares. Se graficó el promedio \pm desviación estándar de un experimento .c) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en núcleos positivos para β -catenina de 20 fibras musculares. Se graficó el promedio \pm desviación estándar de un experimento. D) Cuantificación de núcleos totales por 10000 μ m² de área de miotubo. Fuente: Elaboración propia.

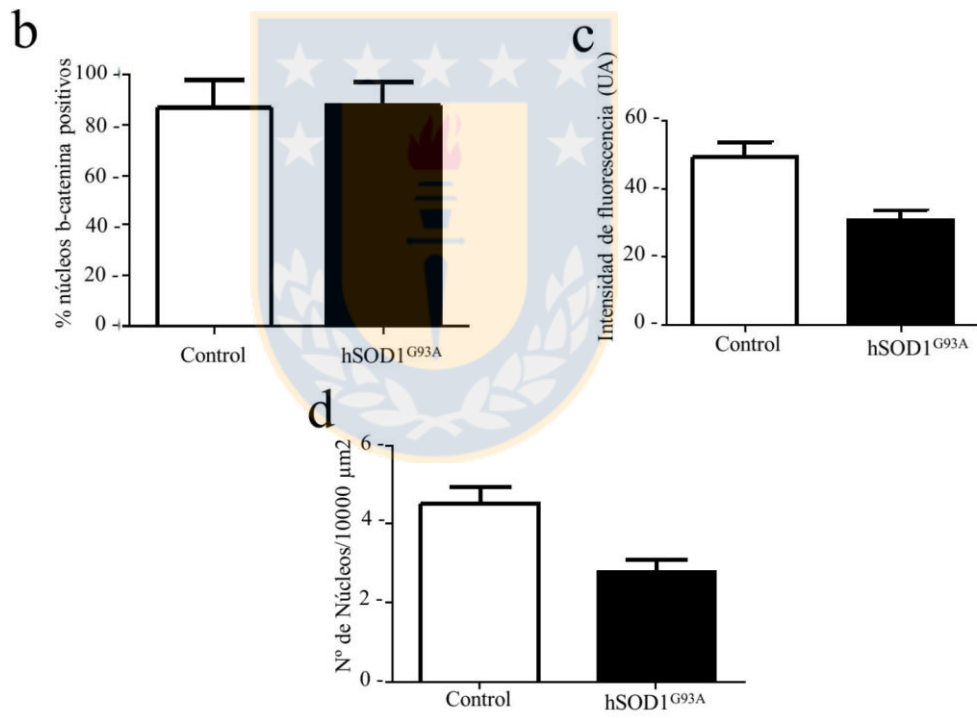
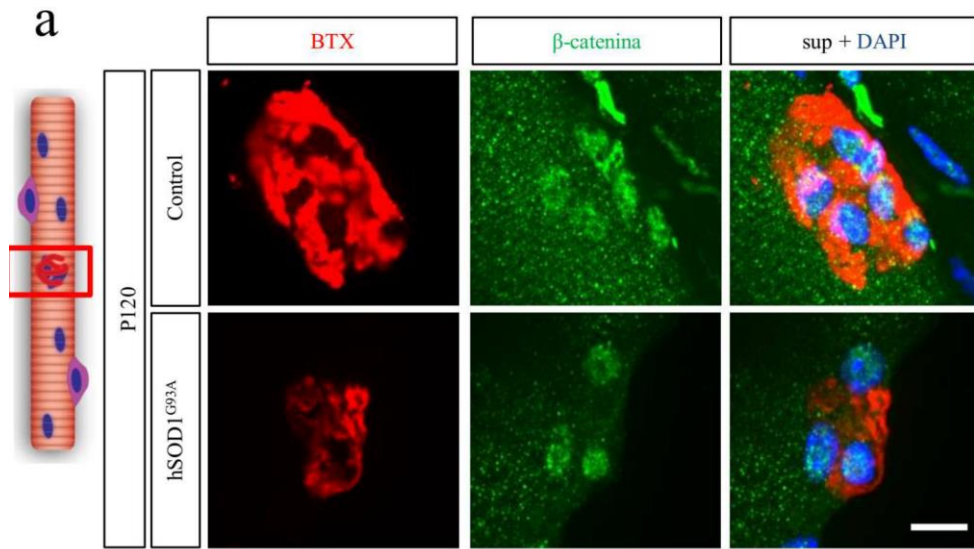


Figura 22: Estudio de la localización de β -catenina en la región sináptica de fibras musculares aisladas de ratones que expresan hSOD1^{G93A}.

Músculos EDL fueron disecados y disgregados para la obtención de fibras musculares aisladas de ratones que expresan hSOD1^{G93A} y control a) Esquema de una fibra muscular con la región sináptica seleccionada en rojo. El panel muestra los agregados del AChR marcados con α -BTX acoplado a Alexa 546 (rojo, panel izquierdo) y las fibras teñidas con un anticuerpo de conejo anti- β -catenina (verde, panel medio). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 488. Barra= 7 μ m. b) Cuantificación del porcentaje de núcleos positivos para β -catenina de 15 fibras musculares. Se graficó el promedio \pm desviación estándar de un experimento c) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en núcleos positivos para β -catenina. Se graficó el promedio \pm desviación estándar de un experimento. d) Cuantificación del número de núcleos localizados bajo los agregados del AChR. Fuente: Elaboración propia.

Por su parte, los resultados del análisis de la región sináptica mostraron una disminución del número de núcleos totales asociados a la ubicación del aparato post-sináptico en fibras de ratones que expresan hSOD1^{G93A} (Control: $4,6 \pm 0,4$; hSOD1^{G93A}: $2,8 \pm 0,3$,x,x). Los núcleos sub-sinápticos son, en su mayoría, positivos para β -catenina en ambos genotipos (Control: $86,67 \pm 11$; hSOD1^{G93A}: $87,96 \pm 8,68\%$, n=1); sin embargo, los resultados indican una disminución de la intensidad de β -catenina en los núcleos provenientes de fibras musculares hSOD1^{G93A} (Control: $50,54 \pm 9,72$, hSOD1^{G93A}: 21.43 ± 12 , n=1).

Estos resultados muestran un comportamiento diferencial de β -catenina en distintas regiones de la fibra muscular, donde se encuentra incrementada en núcleos extrasinápticos y disminuida en los núcleos sinápticos de fibras musculares que expresan hSOD1^{G93A}.

5.5.3 Estudio de las estructuras postsinápticas inducidas por laminina en cultivo primario de células musculares provenientes de ratones modelos ELA.

Para determinar si la activación de la vía de señalización Wnt se encuentra relacionada al proceso de formación de agregados del AChR independientes de señales inducidas por el nervio, se realizaron cultivos primarios de células satélite musculares, las cuales fueron diferenciadas a miotubos en cultivo sobre laminina (Kummer et al 2004, Kummer et al 2006), condición

previamente descrita como una señal de agregación para el AChR (Kummer et al 2004, Kummer et al 2006). Posteriormente, los miotubos en cultivo fueron tratados con la droga activadora de la vía Wnt ANDRO a una concentración de 10 μ m, o la proteína recombinante Dkk1 a una concentración de 20 nM, utilizando DMSO como tratamiento control para ambos casos. Estos cultivos fueron fijados con y teñidos con anticuerpo anti β -catenina, α -BTX y DAPI.

Los resultados muestran que las estructuras postsinápticas son de menor tamaño y fragmentadas en miotubos que expresan hSOD1^{G93A} respecto a miotubos control, mientras que la intensidad e fluorescencia de b-catenina es menor en en miotubos que expresan hSOD1^{G93A} respecto al control. Por otra parte, el tratamiento con el inhibidor Dkk1 induce un incremento en el tamaño de las estructuras postsinápticas en ambos genotipos. Por el contrario el tratamiento con ANDRO incrementan las áreas carentes de AChR y reduce el tamaño de las estructuras postsinápticas. Estos resultados se correlacionan con una disminución y posterior incremento de la intensidad de b-catenina en respuesta a los tratamientos farmacológicos. En conjunto estos datos indican que la expresión de la proteína con la mutación hSOD1^{G93A} reduce la capacidad de las células musculares para agregar a los AChR. Por otra parte, la activación de la vía de señalización Wnt induce la desagregación del AChR.

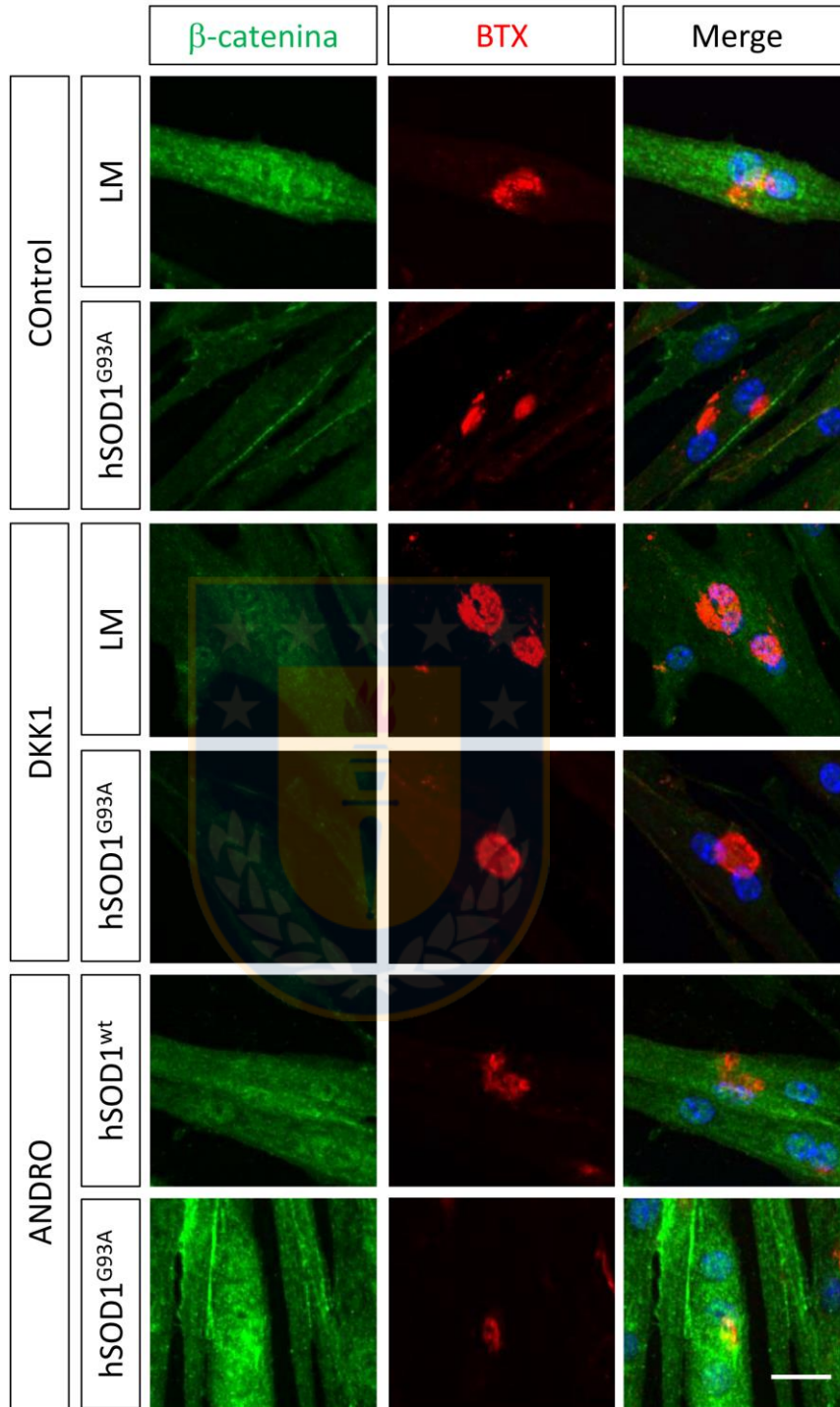


Figura 23: Estudio de la función de la vía de señalización Wnt en la formación de estructuras postsinápticas en cultivo primario de células musculares modelo de ELA.

Células satélites obtenidas de ratones que expresan hSOD1^{G93A} y control fueron sembradas sobre laminina y diferenciadas a miotubos durante 5 días. Los cultivos fueron incubados con la proteína recombinante Dkk1 a una concentración de 20 nM o ANDRO 25 μ M durante 16 h. Los miotubos fueron teñidos con anti- β -catenina, las estructuras postsinápticas fueron marcadas con α -BTX acoplada a Alexa 546 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Se observan estructuras postsinápticas fragmentadas en miotubos que expresan hSOD1^{G93A} asociados a una disminución de la intensidad de β -catenina. La activación de la señalización Wnt con ANDRO reduce el tamaño de estructuras postsinápticas, mientras que la inhibición de la vía con Dkk1 incrementa el área de éstas, en miotubos que expresan hSOD1^{G93A} y control. Fuente: Elaboración propia.

6. Discusión

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la degeneración y muerte de las neuronas motoras. Si bien la mayoría de los casos son esporádicos, un 5% de los pacientes presentan mutaciones en diversas proteínas, entre las cuales las más comunes son SOD1, FUS y TDP-43 (Andersen & Al-Chalabi 2011). De ellas el 20% de los casos de ELA se encuentran asociados con mutaciones en la proteína SOD1. El descubrimiento de las mutaciones en estos genes ha permitido la generación de diversos modelos de estudio tanto in vitro como in vivo, siendo ratones que expresan la mutación G93A un modelo ampliamente utilizado debido a que desarrollan una progresiva degeneración de neuronas motoras y signos clínicos similares a la enfermedad desarrollada en humanos (Gurney et al 1994). El mecanismo por medio del cual las mutaciones de SOD1 conducen a la degeneración de las neuronas motoras no es aun completamente entendido, aunque se ha establecido que este efecto se relaciona con una ganancia de función tóxica en vez de la pérdida de su función enzimática (Saxena & Caroni 2011).

A partir de estudios basados en las mutaciones de hSOD1 se han descrito múltiples procesos patológicos que llevan a neurodegeneración. Entre ellos se incluyen la alteración de las vías de degradación proteica, la acumulación de proteínas mal plegadas, la disfunción mitocondrial, la acumulación de

neurofilamentos fosforilados, la alteración del transporte axonal, apoptosis, alteración del procesamiento de ARN, y una marcada proliferación de astrocitos y microglías (Bruijn et al 2004b, Chio et al 2009, Pasinelli & Brown 2006, Wijesekera & Leigh 2009). Estas alteraciones también se presentan en modelos basados en mutaciones de TDP43 o FUS. Sin embargo, los tratamientos disponibles únicamente están dirigidos a la atenuación de síntomas (Phukan & Hardiman 2009). De hecho, el único fármaco aprobado para el tratamiento de ELA es riluzole, un inhibidor de la liberación de glutamato, el cual incrementa el tiempo de supervivencia de los pacientes de 3 a 5 meses (Miller et al 2012). Por lo tanto, la búsqueda de nuevos modelos de la enfermedad, así como de nuevos posibles mecanismos involucrados en la degeneración de las neuronas motoras es un campo de activa investigación.

Aun cuando los datos obtenidos a partir de muestras humanas son relevantes en los estudios de esta enfermedad, éstos arrojan información acerca de los estadios finales de la misma. La expresión de hSOD1 mutante, durante toda la vida de los individuos, no se manifiesta en síntomas clínicos sino hasta la adultez, desde el estadio postnatal P90 en ratones (Gurney et al 1994). Lo anterior revela la relevancia de la obtención de información acerca de alteraciones previas al inicio de las manifestaciones clínicas (Vinsant et al 2013a, Vinsant et al 2013b), con la finalidad de determinar los mecanismos involucrados en el origen de la enfermedad, que puedan dar luces para el desarrollo de posibles alternativas terapéuticas efectivas en pacientes.

El análisis de estadios presintomáticos en modelos in vivo de ELA ha descrito diversas alteraciones. En ratones transgénicos que expresan la mutación hSOD1^{G85R} existen fallas en el comportamiento sensomotor, como la disminución de la respuesta de enderezamiento durante la primera semana postnatal (Amendola et al 2004). En cultivo de neuronas obtenidos de médula espinal de ratones que expresan hSOD1^{G93A}, se ha descrito un incremento de las corrientes de sodio (Kuo et al 2006, Kuo et al 2005, Kuo et al 2004). De forma similar, neuronas motoras del núcleo hipogloso e interneuronas de animales modelos de ELA recién nacidos presentan un incremento de las corrientes de sodio y calcio (Jiang et al 2009, Quinlan et al 2011, van Zundert et al 2008), apoyando un incremento de la excitabilidad neuronal previo al inicio de los síntomas. Otras características celulares reportadas en etapas presintomáticas son la fragmentación del aparato de Golgi (Gomes et al 2008, Mourelatos et al 1996, Pinto et al 2013, Stieber et al 2004), la disfunción mitocondrial (Kaus & Sareen 2015) y, de forma importante, la disrupción de la unión neuromuscular (Frey et al 2000). Esta última observación ha dado origen a la teoría de degeneración retrógrada, que establece que la degeneración neuronal comienza desde la sinapsis hacia el soma (Dobrowolny 2005, Dobrowolny et al 2011, Dobrowolny et al 2008, Dupuis & Loeffler 2009, Wang et al 2008b).

Tomando en cuenta el conjunto de alteraciones previas al inicio de los síntomas, nuestro foco fue orientado a estudiar si la ELA podría ser gatillada

por cambios en el desarrollo temprano en las neuronas motoras. En este trabajo de tesis hemos utilizado un modelo in vitro de ELA dado por células NSC34 que expresan de forma estable la proteína hSOD1^{WT} o hSOD1^{G93A} (Gomes et al 2008). La línea celular NSC34 fue generada por fusión de células de neuroblastoma N18TG2 con células precursoras de médula espinal de ratón enriquecidas en precursores de neuronas motoras, por lo que ha sido ampliamente utilizada como modelo de neuronas motoras. Esta línea celular es colinérgica y forma uniones neuromusculares en co-cultivo con miotubos in vitro. Presenta un estado indiferenciado en el que, en presencia de factores de crecimiento, proliferan permitiendo generar un sistema inmortalizado clonal. Además, en ausencia de factores de crecimiento presentan un estado diferenciado tipo neuronal con presencia de neuritas (Cashman et al 1992). En este modelo, hemos caracterizado posibles alteraciones tanto en su diferenciación como en el estado de vías de señalización relevantes en neurodegeneración.

6.1 Caracterización de factores de transcripción en diferenciación de neuronas motoras.

La diferenciación y organización de los diferentes subconjuntos de neuronas motoras están correlacionadas con patrones de expresión de diferentes familias de factores de transcripción (Tanabe & Jessell 1996), entre los cuales se encuentra la familia de las proteínas con dominio LIM. El factor de

transcripción *Isl1* se ha descrito como un marcador temprano de diferenciación en motoneuronas (Ericson et al 1992b), el cual precede a la expresión de los otros genes de la familia LIM (Tsuchida et al 1994), es requerido para la diferenciación (Pfaff et al 1996a) y además continúa siendo expresado en estadios tardíos de la diferenciación, e incluso en estadio adulto (Ericson et al 1992a, Thor et al 1991).

Con el fin de determinar si la expresión de la proteína hSOD1^{G93A} induce cambios en la identidad neuronal en este modelo de ELA, en el presente trabajo se ha determinado la expresión de *Isl1* en células NSC34hSOD1. En estadios indiferenciados *Isl1* se expresa en ambas líneas celulares que expresan hSOD1^{WT} o hSOD1^{G93A}, por lo que este modelo puede ser relacionado con estadios tempranos, indicando el compromiso de diferenciación a neuronas motoras. De forma importante, durante la diferenciación de las células NSC34hSOD1, *Isl1* continúa expresándose sin diferencias entre ambas líneas celulares, consistente con su patrón de expresión en estadios tardíos de diferenciación (Ericson et al 1992a, Thor et al 1991), indicando que la identidad como neuronas motoras no está afectada por la proteína hSOD1 mutada en G93A.

Entre los diversos factores de transcripción característicos que marcan la división final de los progenitores motoneuronales se encuentra Hb9 (Jurata et al 2000), el que es expresado a continuación de *Isl1* (Tanabe et al 1998). En su ausencia, ocurren defectos en la trayectoria de los axones y en la innervación de músculos blanco. Además, su expresión inhibe la expresión

de factores de transcripción que inician la diferenciación a interneuronas, consolidando la diferenciación a neuronas motoras (Arber et al 1999). De hecho, ratones nulos para Hb9 no desarrollan neuronas motoras. El análisis de la expresión de Hb9 muestra que las células NSC34hSOD1^{WT} incrementan la expresión del transcrito y los niveles de proteína de Hb9 en condiciones de diferenciación. La expresión de ambos marcadores, Isl1 y Hb9 en células NSC34hSOD1^{WT} refuerzan las características de neuronas motoras que se han descrito previamente en esta línea celular (Cashman et al 1992, Fukada et al 2004) y refuerzan su uso como modelo de neuronas motoras. En células NSC34 que expresan hSOD1^{G93A} la expresión de Hb9 se encuentra disminuida en condiciones de diferenciación. Por lo tanto, la consolidación de la identidad como neurona motora, se encuentra comprometida en células NSC34hSOD1^{G93A} (Pinto et al 2013). Cabe mencionar que otra proteína utilizada como marcador de fenotipo neuronal es MAP2, la cual es expresada en neuronas postmitóticas y localizada en los procesos neuronales (Harada et al 2002). Células NSC34 que expresan de forma transiente la proteína hSOD1^{G93A} muestran una disminución la expresión de MAP2 y Neurofilamento, en condiciones de diferenciación respecto a las células control (Lee et al 2002).

Los análisis de expresión de proteínas relevantes para la diferenciación han mostrado ser consistentes con ensayos de diferenciación morfológica, en los que células NSC34hSOD1 teñidas contra la proteína asociada a microtúbulos MAP1B, muestra que en condiciones de diferenciación el

porcentaje de células diferenciadas y la longitud de neuritas en las células NSC34hSOD1^{WT} es significativamente mayor que en las células NSC34hSOD1^{G93A} (Gomes et al 2008, Pinto et al 2013). Mientras, la expresión de hSOD1^{G93A} de manera transiente en células NSC34 en condiciones de diferenciación, resulta en que la formación de procesos neuronales se encuentra incluso ausente (Lee et al 2002).

Debido a que la mayoría de estos modelos de ELA son generados por sobreexpresión de la proteína humana SOD1, como es el caso de la línea celular NSC34hSOD1, las conclusiones obtenidas podrían ser derivadas de esta condición. Al respecto, para comprender el efecto de las mutaciones de hSOD1 en motoneuronas humanas, se han desarrollado modelos generados a partir la reprogramación de células somáticas obtenidas de pacientes mediante la expresión de los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y Myc, para la formación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC), las cuales posteriormente se diferencian a neuronas motoras (Dimos et al 2008, Toli et al 2015). En iPSCs derivadas desde pacientes con la mutación para hSOD1^{A4V} se mostró la disminución de neuronas que co-expresan tubulina β III e Islet1, así como una disminución del tamaño de cuerpos celulares, en comparación con las células control (Kiskinis et al 2014). En forma similar, en modelos in vitro basados en células madre embrionarias humanas en las que se sobreexpresan diversas mutaciones de hSOD1, y en modelos basados en iPSC obtenidas de pacientes, las mutaciones para TDP-43 o hSOD1 AA4V, D90A y G93A, presentan una disminución de la longitud de

los procesos neuronales en comparación con las líneas celulares control (Chen et al 2014, Egawa et al 2012, Isobe et al 2015, Kiskinis et al 2014, Sances et al 2016, Yao et al 2013). Este conjunto de evidencias permite establecer que existen alteraciones moleculares tempranas que se relacionan con defectos del proceso de diferenciación de neuronas motoras en ELA.

La diferenciación de los progenitores neuronales a neuronas motoras depende de numerosos eventos de señalización que progresivamente restringen el destino de las células progenitoras, desencadenando la expresión jerárquica de factores de transcripción que producen la especificación a los diferentes subconjuntos de neuronas motoras organizados en grupos en la médula espinal. Entre ellas se encuentran las vías Shh, Wnt y BMP (Agalliu et al 2009, Chesnutt et al 2004, Ericson et al 1996, Ericson et al 1997, Nordström et al 2006, Peljto et al 2010, Thonhoff et al 2009). La diferenciación es iniciada cuando los progenitores ubicados en la región ventral de la médula espinal se encuentran expuestos a la actividad de Shh, mientras que la activación de la vía Wnt se relaciona con la diversificación en los subtipos de neuronas motoras. Por otra parte, se ha descrito que la vía BMP se relaciona con la inhibición de la diferenciación de estas neuronas (Agalliu et al 2009, Benavente et al 2012b, Chesnutt et al 2004, Ericson et al 1996, Ericson et al 1997, Nordström et al 2006, Panchision et al 2001).

A este respecto, se ha demostrado que vías de señalización de morfógenos del desarrollo, como las familias Wnt y BMP, participan en variados procesos fisiológicos como la formación de sinapsis, el establecimiento de la conectividad neuronal y la plasticidad sináptica (Oliva et al 2018, Oliva et al 2013, Purro et al 2012, Purro et al 2014, Salinas 2012). De forma importante, y junto a las funciones documentadas de estas vías de señalización durante distintos procesos ocurridos en el desarrollo embrionario, se ha descrito la expresión de ligandos y receptores de estas vía en el sistema nervioso adulto (Charytoniuk et al 2000b, Chen et al 2003b, Purro et al 2012, Salinas 2012), sugiriendo que ellas cumplen funciones importantes en estadios maduros del SN.

Con el fin de evaluar si las vías Wnt/ β -catenina y BMP/Smad se encuentran involucradas en el desarrollo de la patología de ELA, en este trabajo de tesis ambas vías fueron caracterizadas en el modelo in vitro de células NSC34hSOD1.

6.2 Estudio de la vía de señalización BMP en ELA.

El análisis de la vía de señalización BMP/Smad muestra que la expresión de BMPRII no varía durante la diferenciación de las células que expresan hSOD1^{WT} o hSOD1^{G93A}. Sin embargo, al analizar la fosforilación del efector intracelular Smad, pudimos observar un incremento de los niveles de fosforilación en células NSC34hSOD1^{G93A} indiferenciadas. De forma

consistente, en las células NSC34hSOD1^{G93A}, se ha mostrado también el incremento de la expresión del gen blanco Id1 y el incremento de la actividad transcripcional dependiente de Smad (Pinto et al 2013). Estos hallazgos indican que en células NSC34hSOD1^{G93A} indiferenciadas existe un incremento de la activación de vía BMP/Smad dependiente. Se ha descrito que uno de los efectos de la activación de la vía BMP es suprimir el potencial de diferenciación neuronal (Finley et al 1999, Peljto et al 2010, Ying et al 2003) a través de la consiguiente expresión del factor de transcripción inhibidor de la diferenciación Id1, el cual se ha descrito disminuye los marcadores de diferenciación neurogénicos y mantiene la pluripotencia en cultivos de células madre embrionarias de ratón (Viñals et al 2004, Ying et al 2003). Estas evidencias pueden ser relacionadas con la disminución de la diferenciación neuronal observada en células hSOD1^{G93A}. En apoyo a estas conclusiones, el tratamiento con BMP2 en células NSC34 inhibe la diferenciación morfológica, acompañado por aumento de la fosforilación de Smad y la inducción de Id1 (Benavente et al 2012) tal como se observa en células que expresan hSOD1^{G93A}. A la vez, en neuronas motoras de *Drosophila*, se ha descrito que la activación de la vía BMP/Smad dependiente conduce a la expresión de proteínas involucradas en la diferenciación (Ball et al 2010) como BMPRII (Benavente et al 2012b). Sin embargo, en las células NSC34hSOD1 no se observa un incremento de BMPRII durante la diferenciación.

En modelos in vivo de ELA realizados en *Drosophila*, basados en la expresión de la proteína mutada VAPB^{P58S} o a través tanto de la sobreexpresión como deleción de TDP43, se ha observado la disminución de pMAD, el ortólogo de Smad en mosca, y la disminución de la fosforilación del ortólogo de Smad, lo cual se relaciona con una disminución de la señalización dependiente del BMPRII y defectos en la unión neuromuscular de *Drosophila* (Bayat et al 2011, Deshpande et al 2016, Hirth 2010, Ratnaparkhi et al 2008). En vertebrados, se ha demostrado que en motoneuronas del nervio facial de ratones sometidas a daño, incrementa la expresión del ligando BMP2 (Wang et al 2007b). Nuestros resultados sustentan que la vía BMP se encuentra incrementada en un modelo de ELA. Dicho incremento, por una parte, podría mediar la disminución de la diferenciación neuronal aunque, por otra parte, este incremento no se encuentra relacionado al incremento de proteínas sinápticas (como el BMPRII). Estos resultados correlacionan con modelos in vivo de ELA, donde la disminución de la señalización BMP induce la alteración de la sinapsis neuromuscular (Ratnaparkhi et al 2008). Además, en tejido muscular de pacientes con ELA se observó un incremento del ARNm de Smad8, 1 y 5, hallazgo que fue corroborado en el modelo de ratón con la mutación G93A, donde además se observó un incremento de la fosforilación de estas proteínas Smad. Lo anterior sugiere que estas proteínas pueden ser potencialmente utilizadas en como marcadores de ELA (Si et al 2014).

6.3 Estudio de la vía de señalización Wnt en ELA.

Se ha descrito que el desbalance de la vía Wnt tiene efectos asociados a diversas patologías neurodegenerativas (Galli et al 2014, Inestrosa & Arenas 2010, L'Episcopo et al 2011, Marchetti et al 2013, Purro et al 2014, Tapia-Rojas et al 2015, Tapia-Rojas et al 2016). Para activar la señalización Wnt, se requiere de la unión de un ligando Wnt a un receptor Fzd, los cuales se han implicado en variados procesos, incluidos el crecimiento y guía del axón, sobrevivencia neuronal, neurogénesis postnatal, entre otros (Mardones et al 2016, Varela-Nallar et al 2012b). Con el fin de caracterizar el estado basal de la vía de señalización Wnt en el modelo in vitro de ELA se analizaron los niveles de expresión de receptores Fzd en células NSC34hSOD1. En células NSC34hSOD1^{G93A} la expresión de Fzd4 incrementa significativamente respecto a las células control, mientras el análisis del ARNm del receptor Fzd6 no arrojó diferencias significativas en ninguna de las condiciones.

Existe evidencia que relaciona la expresión de receptores Fzd con ELA. Por ejemplo, en ratones que sobre-expresan hSOD1^{G93A} se ha descrito un incremento de la expresión de transcritos que codifican para diversas proteínas relacionadas a la vía de señalización Wnt (Chen et al 2012, González-Fernández et al 2016, Li et al 2013a, Wang et al 2013, Yu et al 2013). En estadios sintomáticos de la enfermedad incrementa la expresión del transcrito de la mayoría de los receptores Fzd, siendo entre los más expresados Fzd8, Fzd7 y Fzd4, mientras que el ARNm del receptor Fzd6 se

encuentra entre los receptores Fzd con menor variación (González-Fernández et al 2016, Yu et al 2013). El análisis de la localización de los receptores que han mostrado un incremento en la expresión del transcrito, muestra que estos son expresados en distintos tipos celulares. Por ejemplo, por medio de inmunofluorescencia se ha descrito el incremento de la expresión de los receptores receptor Fzd1, Fzd2 y Fzd5 en neuronas motoras, por medio de la colocalización con Tubulina β III o ChAT en estadio sintomáticos de la enfermedad (Gonzalez-Fernandez et al 2016, Li et al 2013a, Wang et al 2013). Respecto a Fzd4, los estudios de expresión han mostrado resultados controversiales. El análisis de expresión en médula espinal de ratones hSOD1^{G93A} por medio de qPCR muestra un incremento de la expresión de Fzd4 (Yu et al 2013), mientras que en otros trabajos en médula espinal de ratones modelo basados en hSOD1^{G93A} se registra una disminución de la expresión de este receptor (González-Fernández et al 2016), en ambos casos en estadios sintomáticos de la enfermedad. En este sentido, es relevante mencionar que en modelos de daño a la médula espinal, por contusión o hemisección, se ha observado un incremento general de la expresión de ligandos Wnt (Fernández-Martos et al 2011), así como de receptores Fzd (González-Fernández et al 2014, Gonzalez et al 2012). Entre ellos, el receptor Fzd4 incrementa en las primeras 6 a 24 h después del daño (González-Fernández et al 2014, Gonzalez et al 2012). De esta forma, los eventos de daño a la médula espinal muestran un perfil de expresión similar a los estadios sintomáticos en ELA.

Aun cuando el efecto del aumento observado para Fzd4 en el modelo de ELA es desconocido, existe evidencia que relaciona a los receptores Fzd con la diferenciación neuronal (González-Fernández et al 2016). Por ejemplo, se ha descrito que el silenciamiento de LRP6 y del receptor Fzd4 inhiben la diferenciación neuronal en células madre neurales humanas (Bengoa-Vergniory et al 2017). Así, el aumento de la expresión de Fzd4 que observamos en el modelo in vitro de ELA podría relacionarse con que la señalización mediada por este receptor promueve un estado de diferenciación en células neuronales afectadas por condiciones nocivas como, en este caso, la expresión de hSOD1^{G93A}.

Alteraciones de la activación de la vía de señalización Wnt han sido relacionadas con patologías degenerativas, entre ellas ELA (Alvarez et al 2004, Chen et al 2012, De Ferrari et al 2003, Pinto et al 2013). En modelos de ELA, por una parte se ha descrito un incremento de los niveles de GSK3 β fosforilado en serina 9 (forma activa), en neuronas motoras de médulas espinales de ratones transgénicos hSOD1^{G93A} en etapas sintomáticas de la enfermedad (Chen et al 2012). Por otra parte, en células NSC34hSOD1^{G93A} se ha descrito la inhibición de la activación transcripcional de la vía de señalización Wnt, evaluada a través de un gen reportero luciferasa comandado por la unión a factores de transcripción TCF/Lef (Pinto et al 2013). Ambas evidencias muestran una inhibición de la actividad de la vía Wnt en ELA. Para correlacionar estos antecedentes con la expresión de componentes de la vía, en este trabajo hemos caracterizado la expresión del

inhibidor de la vía Wnt canónica Dkk1. En células NSC34hSOD1^{G93A} indiferenciadas, observamos un incremento en la expresión del inhibidor de la vía canónica Dkk1, en comparación con las células NSC34hSOD1^{WT}. Esta característica ha sido demostrada también en otras enfermedades neurodegenerativas como EA, donde la expresión de Dkk1 incrementa en cerebros tanto de pacientes como de ratones modelo de la enfermedad (Caricasole et al 2004, Purro et al 2012, Purro et al 2014, Rosi et al 2010). Además, es relevante destacar que la inhibición mediante anticuerpos anti DKK1 en rebanadas de hipocampo tratadas con péptido A β revierte la disminución del número de sinapsis, evidenciada por la recuperación de la colocalización de la proteína postsináptica PSD-95 (postsynaptic density protein 95) y el transportador de glutamato vesicular 1 (V-Glut1), un marcador presináptico, demostrando que la expresión de Dkk1 es requerida para la pérdida de la sinapsis (Purro et al 2012). Más aun, en un modelo in vivo de expresión inducible, ratones que expresan Dkk1 en neuronas hipocampales disminuyen el número de sinapsis así como los índices de aprendizaje y memoria (Marzo et al 2016). Cabe mencionar que, en concordancia con el incremento de la expresión de Dkk1 en el modelo in vitro de ELA, se ha descrito que en muestras de médula espinal de ratones transgénicos modelo de ELA en estadio P108 existe un fuerte incremento de la expresión del transcrito del factor inhibidor de Wnt Wif1 (Yu et al 2013). En su conjunto, estos antecedentes sugieren que la vía de señalización Wnt se encuentra inhibida en modelos de ELA.

De forma importante, otras enfermedades neurodegenerativas presentan alteraciones de la vía de señalización Wnt. Se ha descrito que en cultivo de neuronas hipocampales tratadas con el péptido A β (modelo in vitro de EA) existe un incremento en la apoptosis neuronal, así como un incremento en la actividad de GSK3- β , una inducción en la desestabilización de β -catenina citosólica y una reducción en la transcripción de genes blanco (Alvarez et al 2004, De Ferrari et al 2003, Garrido et al 2002), mostrando que esta vía de señalización se encuentra deprimida en EA (De Ferrari & Inestrosa 2000, Inestrosa & Toledo 2008). Por otra parte, en modelos de EH, se ha descrito la estabilización de β -catenina citosólica no disponible para inducir su efecto transcripcional (Godin et al 2010). En modelos in vitro de EP inducidos por droga (células PC12 expuestas a la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; MPP+), se observa un incremento en la expresión de Dkk1 y de la proteína proapoptótica Bax, sugiriendo que la disminución de la actividad de la vía Wnt se relaciona con la muerte celular (Dun et al 2013). Por otra parte, en el mismo modelo se observa una disminución de β -catenina y un incremento de la actividad de Gsk3 α s (Zhou et al 2016). En modelos in vivo de EP utilizando la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), se ha descrito la disminución de la expresión del ligando Wnt1 y del receptor Fzd1 (L'Episcopo et al 2011). En su conjunto, estos antecedentes sugieren que la disminución de la vía de señalización Wnt puede ser una característica compartida en enfermedades neurodegenerativas.

Los resultados del presente trabajo de tesis, revelan que la señalización mediada por morfógenos está alterada en un modelo de ELA. Al respecto, existe evidencia respecto a que Shh es un morfógeno esencial en el desarrollo del sistema nervioso, que continúa su expresión en el sistema nervioso adulto. La señalización mediada por Shh ha mostrado funciones neuroprotectoras frente a condiciones de estrés oxidativo y excitotoxicidad (Ma et al 2013, Peterson & Turnbull 2012). En pacientes con ELA, los niveles de la proteína Shh en líquido cefalorraquídeo medidos por ELISA no muestran cambios significativos conforme incrementa el progreso de la enfermedad (Drannik et al 2017). Sin embargo, a través de ensayos de activación de un gen reportero luciferasa que responde al factor de transcripción Gli (dependiente de Shh) en células NSC34 que expresan hSOD1^{G93A}, se observó una reducción significativa de la actividad del reportero, indicando la inhibición de la actividad de la vía Shh en ELA (Drannik et al 2017, Peterson & Turnbull 2012). Por lo tanto, la alteración de la actividad de las vías de morfógenos del desarrollo podrían ser relevantes en el inicio de la enfermedad.

6.4 β -catenina en estructuras agregadas.

En el mecanismo de activación de la vía de señalización Wnt, un efector citosólico clave es la proteína β -catenina. La unión de ligandos Wnt a receptores Fzd inhibe la fosforilación de β -catenina a través de GSK3 β . El

resultado es la acumulación de β -catenina y su translocación al núcleo, donde conduce la activación de la transcripción de genes dependiente de factores TCF/LEF (Ciani & Salinas 2005).

En células NSC34 que expresan de forma estable la proteína hSOD1^{G93A}, se ha descrito la alteración en la localización de β -catenina en estructuras tipo agregados (Pinto et al 2013). En este trabajo de tesis, se ha caracterizado un incremento significativo del número de estructuras por célula en células que expresan hSOD1^{G93A}, así como un incremento del tamaño de estas estructuras. Al comparar la distribución de β -catenina con un modelo in vivo, se ha determinado en médula espinal de ratones transgénicos modelo de ELA que la distribución nucleo-citoplasma de β -catenina se encuentra alterada (Zhang et al 2006). De forma similar, nuestros antecedentes en estadio sintomático muestran que β -catenina se localiza en los núcleos de neuronas motoras en condiciones control. Al contrario, en motoneuronas de ratones transgénicos, β -catenina se encuentra ausente en los núcleos, presentando una distribución citosólica. Sin embargo, en médulas espinales de ratones presintomáticos β -catenina se encuentra formando estructuras tipo agregados en ratones hSOD1^{G93A}, las cuales están ausentes en la condición control, indicando que la alteración de la localización de β -catenina podría tener un rol en estadios tempranos de la enfermedad.

La formación de estructuras agregadas es una característica común en enfermedades neurodegenerativas (Ross & Poirier 2004, Takalo et al 2013).

En otras enfermedades neurodegenerativas, se ha descrito que β -catenina forma parte de estructuras agregadas (Ghanevati & Miller 2005, Godin et al 2010). En cerebros de pacientes con EA se han evidenciado agregados citoplasmáticos de fosfo- β -catenina marcada para ubiquitinación. Además, en cultivos de células N2a tratadas con inhibidores del proteosoma, estos agregados colocalizan con vimentina y γ -tubulina, (Ghanevati & Miller 2005), demostrando su localización en agresomas. Tomando en cuenta estos antecedentes, en este trabajo de tesis se ha caracterizado la distribución de β -catenina junto a diversos marcadores de estructuras agregadas.

Entre los mecanismos de neurotoxicidad planteados en modelos en ELA, la agregación de hSOD1 mutada se ha descrito como una de las causas de la degeneración debido a la interacción con neurofilamentos y organelos como mitocondrias, aparato de Golgi, RER, peroxisomas. (Hayashi et al 2016, Pasinelli & Brown 2006), característica que se presenta en modelos tanto in vitro como in vivo (Bendotti et al 2012, Gomes et al 2010, Onesto et al 2011). Para determinar si las estructuras de β -catenina se relacionan con agregados de hSOD1^{G93A}, células NSC34 transfectadas con hSOD1^{WT} o hSOD1^{G93A} fusionadas a GFP fueron tratadas con el inhibidor de proteosoma MG132 con el objetivo de inducir la agregación de hSOD1. Como se ha descrito previamente, la expresión de SOD1 mutada asociada a la inhibición de proteosoma induce la formación de agregados citoplasmáticos, no así con la expresión de hSOD1^{WT} (Onesto et al 2011). Sin embargo, esta distribución no corresponde a la distribución agregada que muestra β -catenina en células que expresan hSOD1G93A.

En modelos de ELAf como de ELAe, se ha descrito ampliamente la disfunción del sistema ubiquitina-proteosoma (Bruijn et al 2004b, Chung et al 2001). Mas aún y derivado de ésta, se ha determinado la activación de procesos de autofagia y la formación de agresomas (Bendotti et al 2012, Ghavami et al 2014, Takalo et al 2013). Así, la incapacidad de activar apropiadamente vías necesarias para la eliminación o corrección de proteínas mal plegadas, conducen a la formación de agregados citoplasmáticos (Bendotti et al 2012). Debido a que ha sido ampliamente descrita la degradación de β -catenina por parte del sistema ubiquitina-proteosoma (Logan & Nusse 2004), es que estas estructuras observadas en el modelo in vitro de ELA, podrían estar asociadas a alguna de estas vías degradativas. Para relacionar las estructuras de β -catenina a estructuras de vías de degradación proteica, células NSC34hSOD1 fueron tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132. En células NSC34hSOD1^{G93A}, mediante inmunofluorescencia, se observó la formación de agregados de ubiquitina en comparación con las células control. Por otra parte, las estructuras de β -catenina observadas en estas mismas células no co-distribuyen con los agregados de ubiquitina, sugiriendo que la formación de estas estructuras no es dependiente de la inhibición del proteosoma.

Se ha descrito que el proceso de autofagia se encuentra incrementado en pacientes y modelos de ELA (Li et al 2008a). En forma similar, al analizar la vía de autofagia mediante el marcador LC3, se observa un patrón punteado, en células que expresan hSOD1^{G93A}, que sin embargo no colocan con β -

catenina, indicando que β -catenina no se distribuye en autofagosomas. Para determinar si β -catenina se encuentra en inclusiones tipo agresomas, en células NSC34hSOD1 se realizó inmunofluorescencia para β -catenina en conjunto con γ -tubulina, la cual no se distribuye en conjunto con las estructuras de β -catenina. Esto sugiere que las estructuras de β -catenina no se encuentra formando inclusiones en agresomas, como se ha demostrado en modelos de EA (Ghanevati & Miller 2005).

La formación de agregados amiloides requiere la organización de proteínas con motivos hoja beta, en una estructura nuclear ordenada en paralelo a un eje, alrededor del cual incrementa el número de proteínas. Estos agregados han sido descritos en diversas enfermedades neurodegenerativas como las fibras de péptido A β en modelos de EA, en enfermedades ocasionadas por priones, como Creutzfeldt-Jakob, y en EP (Moreno-Gonzalez & Soto 2011). En modelos de ELA no se ha establecido del todo la formación de agregados amiloides. En cortes de médula espinal de ratones modelo de ELA que expresan mutaciones de TDP43, se ha mostrado la formación de agregados amiloides a través de la tinción con Tioflavina S (Bigio et al 2013). Sin embargo en el caso de las mutaciones para SOD1, se ha reportado información contradictoria (Leal et al 2013). Por una parte, se ha descrito que formas insolubles de hSOD1 in vitro presentan una tinción positiva con rojo Congo, apoyando la formación de una estructura tipo amiloide (Durer et al 2009, Furukawa et al 2008). Por otra parte, el análisis en cortes de médula espinal de ratones transgénicos con la mutación hSOD1^{AV4}, muestra la

distribución de hSOD1 en estructuras insolubles β -barril, detectadas mediante un anticuerpo específico para hojas beta entre los residuos 42 a 48 de la proteína SOD1; sin embargo, estas estructuras no presentan una tinción positiva a Th-S o rojo congo (Kerman et al 2010, Leal et al 2013). Nuestros análisis realizados con el colorante Th-T muestran que existen agregados amiloides en células NSC34hSOD1^{G93A}, apoyando la formación de estructuras amiloideas en el modelo in vitro de ELA basado en la expresión de hSOD1G93A. Sin embargo, estas estructuras amiloides no co-localizan con las estructuras de β -catenina.

En su conjunto, estos resultados indican que las estructuras de β -catenina no se encuentran asociadas una vía específica, ni formando estructuras insolubles estables. Por ello, otra posibilidad que se ha abordado es que ellas puedan corresponder a estructuras transitorias. Para estudiar esta posibilidad se estudió la distribución de β -catenina con marcadores de gránulos de estrés, los cuales corresponden a estructuras donde ribonucleoproteínas y ARN mensajeros se compartimentalizan de manera transitoria bajo el efecto de estímulos estresantes. En este trabajo, se utilizó un modelo de inducción de estrés oxidativo mediante tratamientos con arsenito de sodio (NaAsO₂; (Tourrière et al 2003). En modelos de ELAf basados en las mutaciones de TDP43 y FUS se ha descrito la presencia de gránulos de estrés; sin embargo, en modelos basados en mutaciones para SOD1 estos no han sido documentados (Bosco et al 2010b, Colombrita et al 2009, Liu-Yesucevitz et al 2010). Nuestros resultados indican que las células

NSC34hSOD1 tienen la capacidad de formar de gránulos de estrés, siendo más abundantes y de mayor tamaño en células NSC34hSOD1^{G93A}, revelando que la expresión de hSOD1 mutada induce una mayor susceptibilidad al estrés. Sin embargo, estos gránulos no co-distribuyen con las estructuras de β -catenina.

El mal plegamiento de proteínas conduce también a la formación de agregados amorfos. La agregación amorfa se caracteriza por formar conjuntos de proteínas nativas o denaturadas, sin formar una estructura específica ordenada (Stranks et al 2009, Yoshimura et al 2012). Los agregados amorfos se forman en un proceso tridimensional, donde los monómeros pueden ser añadidos sobre el agregado en cualquier dirección (Stranks et al 2009). Además, se ha reportado la presencia de agregados amorfos en modelos de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, existen agregados amorfos cubriendo a los ovillos neurofibrilares encontrados en pacientes con EA (Qureshi et al 2013). Por otra parte, α -sinucleína forma no solo agregados amiloidogénicos sino también amorfos, que han sido observados en modelos de EP (Breydo et al 2012). En modelos in vitro de ELA, se ha descrito que SOD1 mutada es agregada por el incremento de la concentración de calcio, en agregados amorfos. Por lo tanto, futuros experimentos de microscopía electrónica permitirán evaluar la posibilidad de que los agregados de β -catenina detectados en el modelo in vitro de ELA posean características de tipo amorfas.

β -catenina, además de sus funciones como factor de transcripción, cumple funciones formando uniones adherentes con las proteínas cadherinas (Arikkath and Reichardt 2008). El cambio de β -catenina entre estas funciones se encuentra mediado por diversas fosforilaciones que conducen a β -catenina a su función transcripcional o bien a su función en uniones adherentes (Bienz 2005). Nuestros resultados indican que existe expresión abundante de E-cadherina en ambas células NSC34hSOD1, mientras que la expresión de la forma neuronal, N-cadherina, se circunscribe a puntos discretos entre células. Además, observamos que β -catenina no co-localiza con la marca de estas proteínas de adhesión celular. Para determinar si las células NSC34hSOD1 tienen alterada la función de adhesión célula-célula, se realizó la cuantificación del número de células adheridas a una monocapa celular. Los resultados indican que la adhesión célula-célula se encuentra disminuida en las células NSC34hSOD1^{G93A}. Una posible interpretación de estos resultados se relaciona con la localización estereotipada de precursores de neuronas motoras durante el desarrollo embrionario temprano. Las neuronas motoras se organizan en poblaciones discretas denominadas “columnas”, entre las cuales se encuentran las columnas laterales (que contiene los somas de neuronas motoras que inervarán las extremidades) y mediales (las que inervarán músculos axiales) (Romanes 1964). Respecto a los determinantes moleculares de esta estructura, se ha descrito que la expresión de cadherinas de tipo II define subconjuntos específicos de neuronas motoras (Price 2002) y que la disminución de la expresión de cadherinas de tipo II en pollo altera la distribución de las neuronas motoras

en la médula espinal (Patel et al 2006, Price et al 2002). Por lo tanto, las proteínas cadherinas de tipo II son relevantes para esta función. La interrupción de la expresión de β -catenina y γ -catenina de forma específica en neuronas motoras, altera la segregación de las columnas motoras en la médula espinal (Demireva et al 2011), lo cual puede resultar en defectos en la organización somatodendrítica (Price et al 2002). Así, las alteraciones que observamos en las interacciones célula-célula en el modelo in vitro de ELA podrían relacionarse a defectos tempranos en la organización de las neuronas motoras en estadios embrionarios del desarrollo del tubo neural.

Además de uniones físicas para mantener la integridad de poblaciones celulares, las células pueden estar acopladas a través de uniones comunicantes (*gap junctions*) (Green et al 2010). Dichas uniones se establecen a través de la unión de hemicanales de células vecinas, conformados por hexámeros de conexinas (Cx) y permiten el paso de moléculas pequeñas como iones y metabolitos (Green et al 2010). De manera interesante, se ha descrito que en neuroesferas cultivadas a partir de células progenitoras neurales obtenidas de cerebro fetal humano existe una colocalización entre conexina-43 y β -catenina (Rinaldi et al 2015). Además, en el contexto de ELA se ha descrito que conexina 43 incrementa su expresión en células gliales de ratones que expresan hSOD1G93A en médula espinal, así como en cultivo de astrocitos obtenidos a partir del mismo modelo. Además, se ha descrito un incremento en la expresión de Cx43 tanto en corteza motora como en médula espinal de pacientes con

ELA (Almad et al 2016). Nuestros resultados por inmunocitoquímica muestran que las células NSC34hSOD1 expresan Cx43 y que la marca para esta proteína aumenta en células con la mutación hSOD1^{G93A}. Aun cuando nuestros experimentos muestran una co-localización entre Cx43 y β -catenina circunscrita a algunas regiones de unión célula-célula, en términos funcionales, las células NSC34hSOD1^{G93A} presentan un mayor índice de acoplamiento, medido por la difusión de un colorante microinyectado.

Se ha descrito que durante el periodo de neurogénesis la expresión de Cx43 se encuentra incrementada en los progenitores neuronales y que además su expresión disminuye cuando las neuronas empiezan a diferenciarse (Trosko et al 2000). Más aún, en células progenitoras neuronales obtenidas de cerebro fetal humano, el silenciamiento de Cx43 incrementa el número de células diferenciadas (Rinaldi et al 2015). Esto podría relacionar el incremento de Cx43 con la disminución de la diferenciación en las células que expresan hSOD1^{G93A}. Por otra parte, en células madre neurales se ha descrito que el silenciamiento de Cx43 incrementa los niveles de β -catenina transcripcionalmente activa (Rinaldi et al 2015). Estos antecedentes podrían relacionar el incremento de Cx43 observado en células NSC34hSOD1^{G93A} con la disminución de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina (Pinto et al 2013), configurando un potencial esquema en el que el incremento de Cx43 disminuya la actividad transcripcional de β -catenina, gatillando con ello una disminución de la diferenciación a neuronas motoras (Pinto et al 2013).

Por otra parte, en términos funcionales, la formación de uniones comunicantes facilita el intercambio de metabolitos, iones (potasio, calcio) y segundos mensajeros (AMPc, IP3, ATP) (Kielian 2008). En relación a estos resultados y al contexto de ELA, un incremento del acoplamiento entre precursores de neuronas motoras o, eventualmente, entre motoneuronas y células gliales, podría producir un desbalance de la homeostasis de calcio citosólico. Al respecto, se ha descrito un incremento de calcio citosólico tanto en modelos de ratones transgénicos que expresan hSOD1G93A como en pacientes de ELAe, lo cual puede conducir a alteraciones en la función mitocondrial, incremento de la producción de radicales libres, e inducir la activación de diversas proteínas sensibles a calcio como calpainas, protein kinasa C y endonucleasas, cuya consecuencia podría ser la activación de vías apoptóticas y muerte celular (Appel et al 2001).

En su conjunto, esta serie de antecedentes sugieren que las estructuras de β -catenina no forman parte de uniones adherentes. Sin embargo, ellos muestran que las células que expresan hSOD1G93A se encuentran acopladas, lo que está acompañado de un incremento en la expresión de Cx43. Esto último podría relacionarse con la disminución de la actividad transcripcional de la vía de señalización Wnt, así como con un incremento de los niveles de calcio citosólico y, con ello, el inicio de la degeneración neuronal.

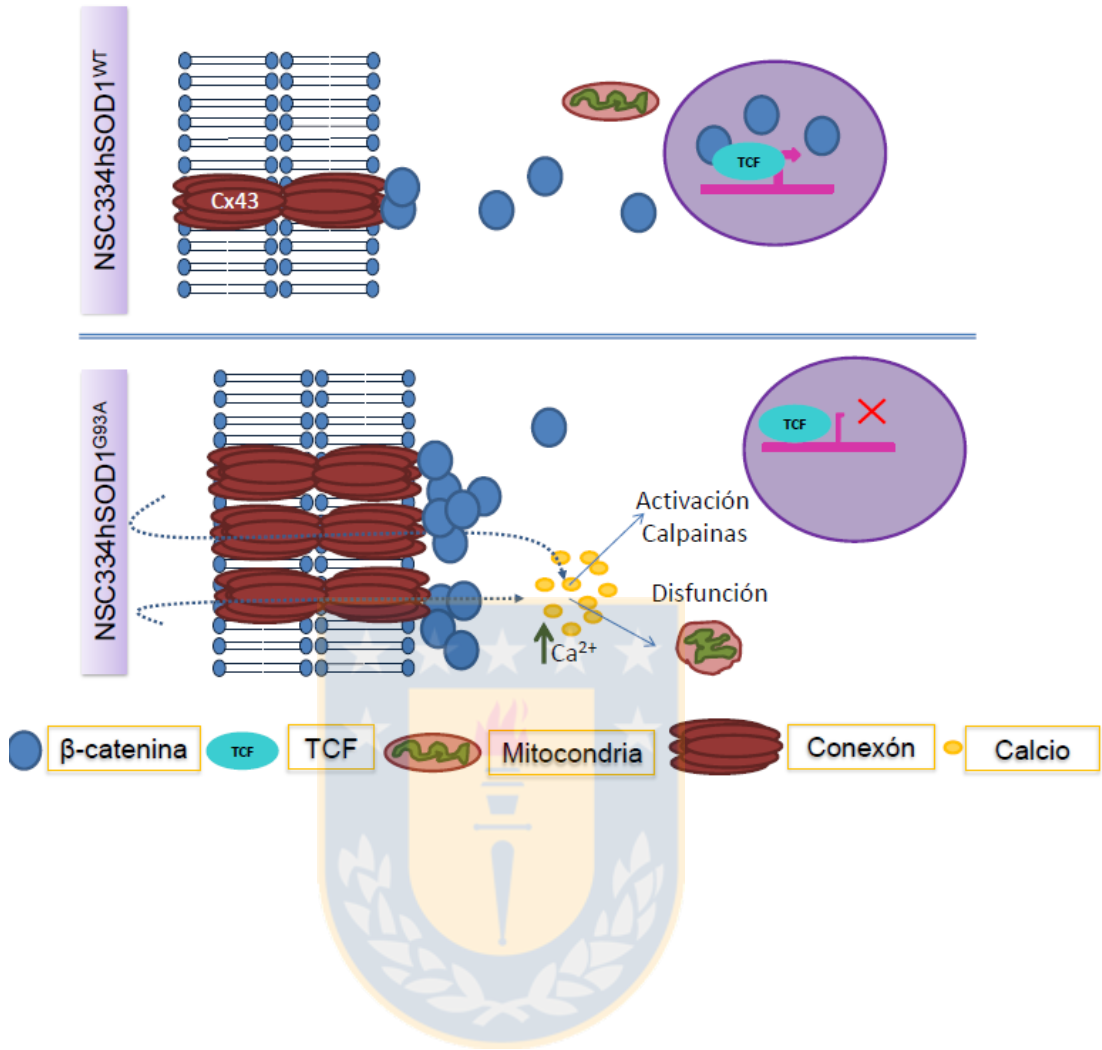


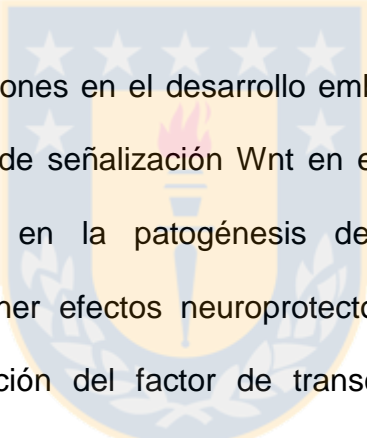
Figura 24. Posible interacción entre Conexina 43 y β -catenina.

La oposición de dos conexones provenientes de dos células forma una unión comunicante a través de la cual pueden transitar metabolitos e iones como por ejemplo el ión calcio. Por otra parte, se ha descrito que dominio intracelular de las conexinas es capaz de interactuar con la proteína β -catenina. En una situación control, dada por las células NSC34hSOD1^{WT} (panel superior) β -catenina interacciona con conexinas, existiendo a su vez una subpoblación que transloca al núcleo e induce la transcripción de genes blanco (panel superior, derecha). Sin embargo, en células que expresan hSOD1^{G93A} (panel inferior) se ha descrito un incremento en acoplamiento celular y la expresión de Conexina-43 (panel inferior). Dicho aumento puede inducir el secuentro de β -catenina citosólica en estructuras (panel inferior a la izquierda) y la consiguiente disminución de la actividad transcripcional de la vía de señalización Wnt, así como contribuir al incremento de la concentración calcio citosólico, induciendo la actividad proteolítica de calpains y la disfunción de la función mitocondrial.

6.5 Función de las estructuras de β -catenina.

Debido a que las estructuras de β -catenina no se relacionan a algún proceso de agregación proteica en particular, estudiamos la posibilidad de que su distribución pueda ser sujeta a modificación. En este sentido, la distribución celular de β -catenina entre compartimentos asociados a la membrana, el citosol y el núcleo es regulada por la activación de la vía Wnt/ β -catenina (Ciani & Salinas 2005). Nuestros experimentos utilizando tratamientos con los activadores de la vía Wnt Litio o ANDRO en células NSC34hSOD1^{G93A} muestran que la activación de la vía Wnt canónica induce el desensamble de las estructuras de β -catenina. En base a este resultado, es factible preguntarse si β -catenina que fue desensamblada de estas estructuras está disponible para actividad transcripcional dependiente de Wnt. A este respecto, en células NSC34hSOD1 tratadas con litio se observó un incremento de la intensidad de β -catenina en el núcleo en la línea celular control, característica ausente en células NSC34hSOD1^{G93A} (Pinto et al 2013). De manera similar, en cultivo primario de fibroblastos obtenidos de pacientes con EA que presentan mutaciones en presinilina-1 se ha descrito que el tratamiento con litio disminuye la capacidad de β -catenina de translocar al núcleo (Nishimura et al 1999). Por otra parte, la sobreexpresión de β -catenina en células HEK-293 conduce a la formación de estructuras agregadas formadas principalmente en el núcleo, lo que está asociado a la disminución de la transcripción de genes blanco (Jazi & Najafi 2017). En un paralelo con estos hallazgos, nuestros resultados muestran un incremento

de los niveles proteicos de β -catenina citosólico en células NSC34hSOD1^{G93A}. Sin embargo, en el modelo de ELA, las estructuras presentan una distribución citosólica en vez de nuclear. Al respecto, se ha descrito que el complejo de poro nuclear presenta alteraciones en neuronas motoras de modelos de ELA (Zhang et al 2006), lo cual podría dificultar el transporte núcleo-citoplasma de β -catenina, reduciendo así su translocación al núcleo, antecedente que se correlaciona con la disminución de la actividad transcripcional observada en el modelo in vitro (Pinto et al 2013).



Además de sus funciones en el desarrollo embrionario, un descontrol en la regulación de la vía de señalización Wnt en el sistema nervioso adulto se encuentra asociada en la patogénesis de enfermedades, donde su activación resulta tener efectos neuroprotectores. Se ha descrito que la inhibición de la función del factor de transcripción TCF por medio de transfección de una forma dominante negativa en neuronas hipocampales incrementa la apoptosis neuronal. Este efecto fue revertido por la co-expresión con TCF, indicando que la señalización dependiente de TCF cumple un rol neuroprotector y que la reducción de los niveles de β -catenina podría incrementar la vulnerabilidad a la apoptosis (Patapoutian & Reichardt 2000, Zhang et al 1998). Más aún, en ratones que expresan Dkk1 de manera inducible en neuronas hipocampales disminuye el número de sinapsis, así como los índices de aprendizaje y memoria (Marzo et al 2016). Por lo tanto, la disminución de la actividad de la vía de señalización Wnt podría contribuir al desarrollo de procesos neurodegenerativos que podrían conducir a la

muerte celular en el cerebro adulto envejecido. Como una primera aproximación para determinar los posibles efectos de la activación de la vía Wnt, en este trabajo se analizó el proceso de diferenciación neuronal, el que se ha descrito previamente disminuido en modelos de ELA (Chen et al 2014, Lee et al 2002, Magrane et al 2009, Pinto et al 2013). La activación farmacológica de la vía Wnt mostró un incremento del número de células que proyectan neuritas, sin afectar la longitud promedio de las mismas, en células NSC34hSOD1^{G93A}. En forma similar, la expresión del ligando Wnt2, el cual se ha descrito que incrementa su expresión en médula espinal de ratones modelo de ELA y en modelos de daño de la médula espinal (González-Fernández et al 2016, Li et al 2013a, Yu et al 2013), indujo una recuperación del número de células con neuritas en el modelo NSC34hSOD1^{G93A}. A este respecto, en neuronas hipocampales, la activación directa de la vía canónica de señalización Wnt por litio, o por el tratamiento con medios condicionados enriquecidos en Wnt-3a, previene los efectos tóxicos inducidos por el péptido A β sobre la viabilidad y morfología celular, previniendo la apoptosis y manteniendo la longitud de los procesos neuronales (Alvarez et al 2004, De Ferrari et al 2003). El análisis los componentes de la vía Wnt mostró un incremento de β -catenina y de la transcripción de sus genes blanco (Alvarez et al 2004). Además, la incubación con litio mostro la acumulacion de β -catenina en el citoplasma y el núcleo (De Ferrari et al 2003). Por otra parte, en modelos in vivo de EP, el daño neuronal fue revertido por el tratamiento con litio o el ligando Wnt1 (L'Episcopo et al 2011, Libro et al 2016).

En su conjunto, nuestros resultados indican que la vía de señalización Wnt podría ejercer un efecto positivo temprano sobre neuronas motoras de ELA, pues su activación induce una recuperación en la población de células que proyectan procesos neuronales, no así en su extensión, evento que ocurre en forma más tardía y que es mediado por vías de señalización locales (Ciani et al 2004, Zou 2004). El efecto observado se podría relacionar con la iniciación de un programa genético temprano de diferenciación hacia motoneuronas, proceso que en el modelo de ELA podría estar afectado por la drástica disminución que observamos en la expresión del factor de transcripción Hb9, que consolida la diferenciación hacia este fenotipo.

6.6 Análisis de la UNM en modelos de ELA

Aunque los mecanismos moleculares que regulan la formación de la sinapsis se encuentran bien documentados, poco se conoce acerca de como la estabilidad sináptica es regulada en el sistema nervioso adulto. Notablemente, varias enfermedades neurodegenerativas muestran una temprana pérdida de la sinapsis, mientras que la degeneración neuronal ocurre de manera posterior, concomitante a la manifestación de los síntomas característicos de la enfermedad. Lo anterior sugiere que la pérdida inicial de sinapsis se relaciona con la subsecuente muerte de las neuronas. Por lo tanto, entender los mecanismos que conducen a la desestabilización de esta sinapsis podría conducir a encontrar un blanco terapéutico para la

enfermedad. Se ha descrito que la vía Wnt podría jugar un rol en el mantenimiento sináptico en el cerebro adulto (Dickins & Salinas 2013, Galli et al 2014, Marzo et al 2016, Oliva et al 2018, Oliva et al 2013). En ratones transgénicos modelo de EA y rebanadas de hipocampo tratadas con el péptido A β , la expresión de Dkk1 media la pérdida de la sinapsis (Marzo et al 2016, Purro et al 2012, Rosi et al 2010). Por otra parte, en cultivo de neuronas hipocampales, la incubación con Wnt5a o con el heptapéptido derivado de su secuencia Foxy-5, induce la acumulación de la proteína de andamiaje postsináptica PSD95. Más aun, en cultivo de neuronas hipocampales tratadas con el péptido A β , el ligando Wnt5a previene la disminución de las puntas de PSD95 (Cerpa et al 2010, Varela-Nallar et al 2012a, Varela-Nallar et al 2012b). Por lo tanto, Wnt5a tiene un efecto neuroprotector en modelos in vitro de EA, manteniendo la densidad de contactos sinápticos.

En ELA se ha descrito el desensamble de la unión neuromuscular en estadio P42 de ratones que expresan hSOD1^{G93A}; sin embargo, el inicio de los síntomas se ha descrito en estadio P90 (Frey et al 2000). De forma importante, se ha observado que un incremento de tres veces de la expresión de la proteína quinasa específica de músculo MuSK en ratones hSOD1^{G93A} retrasa la denervación muscular e incrementa la función motora (Pérez-García & Burden 2012). Recientemente, se ha descrito que la inyección única o crónica de un anticuerpo que actúa como agonista de MuSK, resulta en un efecto protector de la degeneración de la sinapsis

neuromuscular y de su función (Burden Lab 2018). Estas evidencias indican que la activación de mecanismos moleculares musculares que conduzcan a la estabilización de aparatos postsinápticos puede ejercer una función protectora sobre la pérdida sináptica en ELA.

Respecto a la UNM de ratones que expresan hSOD1^{G93A}, se ha descrito que los músculos presentan un incremento de la expresión del receptor Fzd9 y una disminución de la expresión del receptor Fzd2 en estadios presintomáticos (de Oliveira et al 2014), indicando que la expresión de hSOD1 mutada en este tejido induce cambios en la expresión de componentes de la vía de señalización Wnt. Por otra parte, se ha descrito que la expresión del receptor Fzd9 en células musculares en cultivo induce el desensamble de agregados del AChR dependientes de agrina, junto con un incremento de los niveles de β -catenina (Avilés et al 2014). Estos antecedentes podrían indicar que la expresión de hSOD1^{G93A} en músculo induce la expresión de proteínas que disminuyen la agregación del receptor de AChR de forma temprana en la patología.

Para analizar si la vía Wnt/ β -catenina se relaciona con la pérdida de la inervación en la UNM de ratones que expresan hSOD1^{G93A}, en este trabajo se estudió la localización de β -catenina en la UNM de animales modelos de ELA y controles. Nuestros análisis muestran que, en la situación control, β -catenina se distribuye junto con el perfil del terminal nervioso y del aparato postsináptico, mientras que en la UNM en ratones que expresan hSOD1^{G93A} se observa la disminución de β -catenina, en estadios sintomáticos de la

enfermedad. Mas aún, la disminución de β -catenina se correlaciona con la disminución de la innervación del aparato postsináptico. De forma similar, nuestros resultados en músculo de ratones que presentan la mutación hSOD1^{G86R} muestran que la intensidad de β -catenina disminuye en la UNM y que la proteína se distribuye de manera difusa en la región innervada. Estos resultados muestran que una disminución de β -catenina en la UNM de ratones puede ser una característica común entre modelos basados en mutaciones de hSOD1.

Con el objetivo de ahondar acerca de la disminución de β -catenina en la UNM de ratones que expresan hSOD1^{G93A}, se realizó la inmunodetección de las formas fosforiladas en Y654 y en Y489 de la proteína. La participación de β -catenina ha sido ampliamente descrita en uniones célula-célula mediadas por cadherinas, donde β -catenina se une al dominio intracelular de cadherinas y a su vez a α -catenina, la cual se une al citoesqueleto de actina (Arikkath & Reichardt 2008, Drees et al 2005). Se ha descrito que la población de β -catenina que participa de uniones célula-célula presenta la fosforilación en Y645 (Bienz 2005). Nuestros resultados muestran la disminución de β -catenina fosforilada en Y654 en la UNM de ratones hSOD1^{G93A}. Aunque no se ha descrito una proteína cadherina en particular en la sinapsis neuromuscular, se ha mencionado la posible expresión de cadherinas en algunas revisiones (Fu et al 2008). Por otra parte, se ha descrito que la fosforilación de β -catenina en Y654 se distribuye en neuronas hipocámpales junto a actina en los terminales de las neuronas, donde la

fosforilación en Y654 es requerida para la extensión del axón, siendo una remodelación dependiente de la formación de un complejo con N-cadherina e independiente de la transcripción mediada por TCF (David et al 2008). De esta forma, si β -catenina estuviese asociada a la función de mantener la adhesión de la sinapsis, este conjunto de resultados podrían indicar que la pérdida de β -catenina se asocia a la pérdida de la adherencia y junto con ello, a la pérdida de la aposición entre el terminal nervioso y el aparato postsináptico que se observa en modelos animales de ELA (Refs).

Por otra parte, se ha descrito que la población de β -catenina que participa en las uniones adherentes también puede ser fosforilada en Y489, lo que conduce a la pérdida de la asociación con proteínas de adhesión para ser destinada a la activación transcripcional. Los resultados de la tinción contra β -catenina fosforilada en Y489 en músculo de ratones que expresan hSOD1^{G93A} muestran que esta subpoblación mantiene su distribución en aparatos postsinápticos, aún cuando estos se encuentran denervados. Para determinar si β -catenina muscular fosforilada en Y489 presenta cambios en estadios pre-sintomáticos de la enfermedad, se realizó la inmunodetección de β -catenina Y489. Nuestros resultados muestran el incremento de la fluorescencia en células musculares que expresan hSOD1^{G93A}. En correlación con estos resultados, se ha descrito un incremento de los niveles proteicos de la población de β -catenina que presenta actividad transcripcional en músculo denervado (Ref). De forma similar, la denervación de fibras musculares muestra un incremento de β -catenina en la región de la

UNM; sin embargo, este incremento no se muestra en el núcleo sino que en la periferia de los núcleos subsinápticos (Kurimoto et al 2015). Por otra parte, el incremento de β -catenina marcada para su función transcripcional en estadios pre-sintomáticos, podría estar relacionada con el incremento de la expresión del receptor Fzd9 (de Oliveira et al 2014), el cual se ha descrito que induce la desagregación de los AChR en la membrana muscular (Avilés et al 2014). En conjunto, estos resultados sugieren un mecanismo mediado por la activación transcripcional dependiente de β -catenina que podría conducir a la desestabilización de la sinapsis neuromuscular.

Por medio de este enfoque metodológico no es posible determinar si la localización de β -catenina en la UNM proviene de los terminales nerviosos o de las células musculares. Además, considerando el incremento de β -catenina Y489 en la región de la UNM, estudiamos la distribución de β -catenina en células musculares. Para ello, a partir de músculo EDL se aislaron fibras musculares, en ausencia del componente presináptico.

La aposición de una fibra muscular junto con un terminal nervioso puede marcar dos regiones de estudio: una región extrasináptica libre de inervación y una región sináptica caracterizada por la presencia del terminal nervioso, la formación de agregados del AChR y los núcleos subsinápticos, los que presentan un incremento de la expresión de proteínas postsinápticas, como el nAChR y MuSK (Ferraro et al 2012).

Nuestros resultados muestran que, en fibras musculares aisladas, β -catenina se distribuye en los núcleos. El análisis de la región sináptica de las

fibras musculares de ratones que expresan hSOD1^{G93A}, muestra una disminución de la intensidad de β -catenina respecto a los controles en los núcleos subsinápticos. Al respecto, se ha descrito en modelos de miastenia congénita, basados en la mutación del dominio CRD de unión a ligando de MuSK, que los niveles de β -catenina se encuentran disminuidos en la UNM, las cuales presenta alteraciones morfológicas de desmantelamiento (Messéant et al 2015). Similares alteraciones morfológicas son visibles en los aparatos postsinápticos presentes en las fibras musculares de ratones con la mutación hSOD1^{G93A}. Así mismo, en experimentos de denervación de músculos de extremidades en ratón se observó un incremento de β -catenina en UNMs en las fibras denervadas; sin embargo, dicho incremento se observa en el citoplasma de la fibra, pero no en el núcleo. De este modo, la disminución de β -catenina en los núcleos subsinápticos podría relacionarse con una disminución en la transcripción de proteínas postsinápticas y con el desensamble de la UNM en ELA. Nuestros resultados muestran un incremento de β -catenina en los núcleos de las fibras musculares. Respecto a la región extrasináptica de las fibras musculares, existe evidencia que apunta a las diferencias con los núcleos subsinápticos, donde se establece que ellos no presentan actividad transcripcional de proteínas postsinápticas (Ferraro et al 2012). La posible función de estos núcleos, así como del aumento de la marca para β -catenina que observamos en ellos en el contexto de ELA podrían representar un interesante blanco de investigación en este campo.

Con el objetivo de determinar la consecuencia funcional de la activación de la señalización Wnt sobre la formación del aparato postsináptico en células musculares, se realizaron cultivos primarios de células satélite obtenidas desde ratones que expresan hSOD1^{G93A} y controles. Estas células fueron cultivadas sobre una superficie de laminina para inducir la agregación de los AChR (Kummer et al 2004). Los resultados muestran que las estructuras postsinápticas obtenidas de ratones que expresan hSOD1^{G93A} son de menor tamaño que las observadas en el cultivo control. Dado que la agregación del AChR en estos cultivos es independiente de señales presinápticas, este resultado sugiere que la expresión de hSOD1 mutada afecta negativamente la capacidad de los miotubos de inducir diferenciación postsináptica. Así, estos hallazgos pueden relacionarse al efecto de rescate que tiene la sobreexpresión de MuSK, el principal organizador de diferenciación postsináptica, respecto a la denervación observada en ratones modelo de ELA (Pérez-García & Burden 2012). Así, el proceso de agregación del AChR en la célula muscular podría estar alterado en ELA. En concordancia con estas conclusiones, se ha descrito que la expresión de hSOD1^{G93A}, específicamente en tejido muscular de ratones, conduce a similares alteraciones en la UNM de ratones de ELA con la misma mutación, más aún, a largo plazo, este modelo de expresión de hSOD1^{G93A} muscular, muestra la disminución de neuronas motoras en la médula espinal, contribuyendo a la teoría de la degeneración retrograda..

Para determinar el efecto de la activación de la vía de señalización Wnt sobre la formación de las estructuras postsinápticas, cultivos primarios de miotubos de ratones control que expresan hSOD1^{G93A} fueron tratados con ANDRO y Dkk1. Los resultados muestran que la activación de la vía Wnt induce la disminución del tamaño de las estructuras postsinápticas, mientras que la inhibición de la vía muestra estructuras postsinápticas de mayor tamaño. Estos antecedentes se relacionan con experimentos en los cuales la vía de señalización Wnt fue activada en células musculares en cultivo a través de tratamientos farmacológicos con litio, Bio, o la incubación con el ligando Wnt3a, en los cuales se observa la disminución de agregados de AChR inducidos por agrina (Henriquez et al 2008, Wang et al 2008a). Por lo tanto, la activación de la vía Wnt canónica podría inducir la desagregación de los AChR y así conducir al desensamble de la sinapsis neuromuscular.

Los antecedentes anteriormente expuestos refuerzan la idea de que las células musculares podrían ser un posible blanco terapéutico en el contexto de ELA. Respecto a la actividad de proteínas secretadas, la expresión restringida en músculo del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) en ratones modelo que expresan hSOD1^{G93A}, ha mostrado incrementar el tiempo de vida de los animales, retrasa la atrofia muscular y mantiene la morfología de los agregados del AChR (Dobrowolny 2005). Además, la expresión de una variante de splicing de IGF-1, MGF, mediante inyección de cADN en músculo en el tiempo del inicio de los síntomas, muestra un incremento en el número de unidades motoras, así como en el tiempo de

vida de los animales (Riddoch-Contreras et al 2009). Por otra parte la expresión en músculo de otros factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado de células gliales GDNF y el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF producen similares resultados (Azzouz et al 2004, Li et al 2003, Li et al 2007, Lunn et al 2009, Wang et al 2002b, Yamamoto et al 2001). Así la alteración de la expresión de estas señales, u otras, podría favorecer el inicio o la progresión de la enfermedad.

En su conjunto, los resultados de este trabajo de tesis aportan nuevas evidencias respecto a los mecanismos que pueden incidir en el inicio de los procesos neurodegenerativos en células que expresan una mutación perteneciente a ELAf, señalando a la disfunción de la vía de señalización Wnt como un factor subyacente a procesos degenerativos, como se ha demostrado en otras enfermedades neurodegenerativas, lo cual podría a futuro ser utilizado como una herramienta terapéutica.

7 CONCLUSIONES:

- β -catenina se distribuye en estructuras no agregadas citosólicas en células que expresan hSOD1G93A.
- La activación de la vía de señalización Wnt induce el descensamble de las estructuras de β -catenina.
- La activación de la vía de señalización Wnt induce la diferenciación de las células en proliferación a un fenotipo neuronal.

- Cambios en la distribución de β -catenina en la sinapsis neuromuscular podrían estar asociados a las fallas sinápticas de la UNM observadas previo a la muerte de neuronas motoras.



8 REFERENCIAS

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *The EMBO Journal* 16: 3797-804
- Aberle H, Haghghi AP, Fetter RD, McCabe BD, Magalhães TR, Goodman CS. 2002. wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 33: 545-58
- Agalliu D, Takada S, Agalliu I, McMahon AP, Jessell TM. 2009. Motor neurons with axial muscle projections specified by Wnt4/5 signaling. *Neuron* 61: 708-20
- Aggarwal A, Nicholson G. 2002. Detection of preclinical motor neurone loss in SOD1 mutation carriers using motor unit number estimation. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 73: 199-201
- Ahn VE, Chu ML-H, Choi H-J, Tran D, Abo A, Weis WI. 2011. Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6. *Developmental Cell* 21: 862-73
- Ajrroud-Driss S, Siddique T. 2015. Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1852: 679-84
- Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, den Berg LH. 2012. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica* 124: 339-52
- Almad AA, Doreswamy A, Gross SK, Richard JP, Huo Y, et al. 2016. Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 64: 1154-69
- Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. 2005. Wnt Proteins Prevent Apoptosis of Both Uncommitted Osteoblast Progenitors and Differentiated Osteoblasts by β -Catenin-dependent and -independent Signaling Cascades Involving Src/ERK and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT. *Journal of Biological Chemistry* 280: 41342-51
- Alvarez AR, Godoy JA, Mullendorff K, Olivares GH, Bronfman M, Inestrosa NC. 2004. Wnt-3a overcomes β -amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. *Experimental Cell Research* 297: 186-96
- Amendola J, Verrier B, Roubertoux P, Durand J. 2004. Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience* 20: 2822-26
- Andersen PM, Al-Chalabi A. 2011. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature Reviews Neurology* 7: 603-15

- Anderson P, Kedersha N. 2008. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences* 33: 141-50
- Anitha M, Shahnava N, Qayed E, Joseph I, Gossrau G, et al. 2009. BMP2 promotes differentiation of nitrergic and catecholaminergic enteric neurons through a Smad1-dependent pathway. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298: G375-G83
- Apel ED, Glass DJ, Moscoso LM, Yancopoulos GD, Sanes JR. 1997. Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron* 18: 623-35
- Appel SH, Beers D, Siklos L, Engelhardt JI, Mosier DR. 2001. Calcium: the darth vader of ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders* 2: 47-54
- Arber S, Burden SJ, Harris AJ. 2002. Patterning of skeletal muscle. *Current Opinion in Neurobiology* 12: 100-03
- Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S. 1999. Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* 23: 659-74
- Arciello M, Capo CR, D'Annibale S, Cozzolino M, Ferri A, et al. 2010. Copper depletion increases the mitochondrial-associated SOD1 in neuronal cells. *BioMetals* 24: 269-78
- Ardiles ÁO, Tapia-Rojas CC, Mandal M, Alexandre F, Kirkwood A, et al. 2012. Postsynaptic dysfunction is associated with spatial and object recognition memory loss in a natural model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 13835-40
- Arikkath J, Reichardt LF. 2008. Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 31: 487-94
- Avilés EC, Pinto C, Hanna P, Ojeda J, Pérez V, et al. 2014. Frizzled-9 impairs acetylcholine receptor clustering in skeletal muscle cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 110
- Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, et al. 2004. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429: 413
- Balice-Gordon RJ, Lichtman JW. 1993. In vivo observations of pre-and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *Journal of Neuroscience* 13: 834-55
- Ball RW, Warren-Paquin M, Tsurudome K, Liao EH, Elazzouzi F, et al. 2010. Retrograde BMP signaling controls synaptic growth at the NMJ by regulating trio expression in motor neurons. *Neuron* 66: 536-49

- Barber SC, Shaw PJ. 2010. Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine* 48: 629-41
- Baron DM, Kaushansky LJ, Ward CL, Sama RRK, Chian R-J, et al. 2013. Amyotrophic lateral sclerosis-linked FUS/TLS alters stress granule assembly and dynamics. *Molecular Neurodegeneration* 8: 30
- Basak A, Cooper S, ROBERGE AG, BANIK UK, CHRÉTIEN M, SEIDAH NG. 1999. Inhibition of proprotein convertases-1,-7 and furin by diterpines of *Andrographis paniculata* and their succinoyl esters. *Biochemical Journal* 338: 107-13
- Basso M, Pozzi S, Tortarolo M, Fiordaliso F, Bisighini C, et al. 2013. Mutant Copper-Zinc Superoxide Dismutase (SOD1) Induces Protein Secretion Pathway Alterations and Exosome Release in Astrocytes: IMPLICATIONS FOR DISEASE SPREADING AND MOTOR NEURON PATHOLOGY IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *Journal of Biological Chemistry* 288: 15699-711
- Bayat V, Jaiswal M, Bellen HJ. 2011. The BMP signaling pathway at the *Drosophila* neuromuscular junction and its links to neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurobiology* 21: 182-88
- Beaumont V, Thompson S-A, Choudhry F, Nuthall H, Glantschnig H, et al. 2007. Evidence for an enhancement of excitatory transmission in adult CNS by Wnt signaling pathway modulation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 35: 513-24
- Bellingham MC. 2011. A Review of the Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis: What have we Learned in the Last Decade? *CNS Neuroscience & Therapeutics* 17: 4-31
- Benavente F, Pinto C, Parada M, Henriquez JP, Osses N. 2012a. Bone morphogenetic protein 2 inhibits neurite outgrowth of motor neuron-like NSC-34 cells and up-regulates its type II receptor. *Journal of neurochemistry* 122: 594-604
- Benavente F, Pinto C, Parada M, Henríquez JP, Osses N. 2012b. Bone morphogenetic protein 2 inhibits neurite outgrowth of motor neuron-like NSC-34 cells and up-regulates its type II receptor. *Journal of Neurochemistry* 122: 594-604
- Bendotti C, Marino M, Cheroni C, Fontana E, Crippa V, et al. 2012. Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: Implication for protein aggregation and immune response. *Progress in Neurobiology* 97: 101-26
- Bengoa-Vergniory N, Gorroño-Etxebarria I, López-Sánchez I, Marra M, Di Chiaro P, Kypta R. 2017. Identification of Noncanonical Wnt Receptors Required for Wnt-3a-Induced Early Differentiation of Human Neural Stem Cells. *Molecular Neurobiology* 54: 6213-24

- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V, Group tARS. 1994. A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine* 330: 585-91
- Bienz M. 2005. β -Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Current Biology* 15: R64-R67
- Bigio EH, Wu JY, Deng H-X, Bit-Ivan EN, Mao Q, et al. 2013. Inclusions in frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy (FTLD-TDP) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), but not FTLD with FUS proteinopathy (FTLD-FUS), have properties of amyloid. *Acta Neuropathologica* 125: 463-65
- Blokhuis AM, Groen EJM, Koppers M, Berg LH, Pasterkamp RJ. 2013. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica* 125: 777-94
- Borchelt DR, Lee MK, Slunt HS, Guarnieri M, Xu ZS, et al. 1994. Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 8292-96
- Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, et al. 2010a. Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Human Molecular Genetics* 19: 4160-75
- Bosco DA, Morfini G, Karabacak NM, Song Y, Gros-Louis F, et al. 2010b. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nature Neuroscience* 13: 1396-403
- Braidy N, Munoz P, Palacios AG, Castellano-Gonzalez G, Inestrosa NC, et al. 2012. Recent rodent models for Alzheimer's disease: clinical implications and basic research. *Journal of neural transmission* 119: 173-95
- Breydo L, Wu JW, Uversky VN. 2012. α -Synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1822: 261-85
- Brujin LI. 1998. Aggregation and Motor Neuron Toxicity of an ALS-Linked SOD1 Mutant Independent from Wild-Type SOD1. *Science* 281: 1851-54
- Brujin LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, et al. 1998. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281: 1851-4
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. 2004a. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annual review of neuroscience* 27: 723-49
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. 2004b. UNRAVELING THE MECHANISMS INVOLVED IN MOTOR NEURON DEGENERATION IN ALS. *Annual Review of Neuroscience* 27: 723-49

- Buchan JR, Parker R. 2009. Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation. *Molecular Cell* 36: 932-41
- Buffelli M, Busetto G, Bidoia C, Favero M, Cangiano A. 2004. Activity-dependent synaptic competition at mammalian neuromuscular junctions. *Physiology* 19: 85-91
- Burden SJ. 2002. Building the vertebrate neuromuscular synapse. *Developmental Neurobiology* 53: 501-11
- Burden SJ, Yumoto N, Zhang W. 2013. The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: a009167
- Byrne S, Walsh C, Lynch C, Bede P, Elamin M, et al. 2010. Rate of familial amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 82: 623-27
- Camins A, Verdaguer E, Junyent F, Yeste-Velasco M, Pelegrí C, et al. 2009. Potential mechanisms involved in the prevention of neurodegenerative diseases by lithium. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 15: 333-44
- Caricasole A, Copani A, Caraci F, Aronica E, Rozemuller AJ, et al. 2004. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *Journal of Neuroscience* 24: 6021-27
- Carmon KS, Lin Q, Gong X, Thomas A, Liu Q. 2012. LGR5 Interacts and Cointernalizes with Wnt Receptors To Modulate Wnt/ β -Catenin Signaling. *Molecular and Cellular Biology* 32: 2054-64
- Cashman NR, Durham HD, Blusztajn JK, Oda K, Tabira T, et al. 1992. Neuroblastoma \times spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Developmental Dynamics* 194: 209-21
- Cerpa W, Farías GG, Godoy JA, Fuenzalida M, Bonansco C, Inestrosa NC. 2010. Wnt-5a occludes A β oligomer-induced depression of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. *Molecular Neurodegeneration* 5: 3
- Chacón MA, Varela-Nallar L, Inestrosa NC. 2008. Frizzled-1 is involved in the neuroprotective effect of Wnt3a against A β oligomers. *Journal of Cellular Physiology* 217: 215-27
- Chang C-F, Lin S-Z, Chiang Y-H, Morales M, Chou J, et al. 2003. Intravenous administration of bone morphogenetic protein-7 after ischemia improves motor function in stroke rats. *Stroke* 34: 558-64
- Charron F, Tessier-Lavigne M. 2005. Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* 132: 2251-62

- Charytoniuk D, Traiffort E, Pinard E, Issertial O, Seylaz J, Ruat M. 2000a. Distribution of bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein receptor transcripts in the rodent nervous system and up-regulation of bone morphogenetic protein receptor type II in hippocampal dentate gyrus in a rat model of global cerebral ischemia. *Neuroscience* 100: 33-43
- Charytoniuk DA, Traiffort E, Pinard E, Issertial O, Seylaz J, Ruat M. 2000b. Distribution of bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein receptor transcripts in the rodent nervous system and up-regulation of bone morphogenetic protein receptor type II in hippocampal dentate gyrus in a rat model of global cerebral ischemia. *Neuroscience* 100: 33-43
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. 2004. Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors* 22: 233-41
- Chen H-L, Lein PJ, Wang J-Y, Gash D, Hoffer BJ, Chiang Y-H. 2003a. Expression of bone morphogenetic proteins in the brain during normal aging and in 6-hydroxydopamine-lesioned animals. *Brain Research* 994: 81-90
- Chen H, Qian K, Du Z, Cao J, Petersen A, et al. 2014. Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell* 14: 796-809
- Chen HL, Lein PJ, Wang JY, Gash D, Hoffer BJ, Chiang YH. 2003b. Expression of bone morphogenetic proteins in the brain during normal aging and in 6-hydroxydopamine-lesioned animals. *Brain research* 994: 81-90
- Chen L, Liu B. 2017. Relationships between stress granules, oxidative stress, and neurodegenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017
- Chen Y, Guan Y, Liu H, Wu X, Yu L, et al. 2012. Activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is associated with glial proliferation in the adult spinal cord of ALS transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420: 397-403
- Cheroni C, Marino M, Tortarolo M, Veglianese P, De Biasi S, et al. 2008. Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics* 18: 82-96
- Chesnutt C, Burrus LW, Brown AM, Niswander L. 2004. Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGF β and WNT activity. *Developmental Biology* 274: 334-47
- Chio A, Borghero G, Calvo A, Capasso M, Caponnetto C, et al. 2010. Lithium carbonate in amyotrophic lateral sclerosis: Lack of efficacy in a dose-finding trial. *Neurology* 75: 619-25
- Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, et al. 2013. Global Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review of the Published Literature. *Neuroepidemiology* 41: 118-30

- Chio A, Schymick JC, Restagno G, Scholz SW, Lombardo F, et al. 2009. A two-stage genome-wide association study of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics* 18: 1524-32
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9
- Chou H-J, Lai D-M, Huang C-W, McLennan IS, Wang H-D, Wang P-Y. 2013. BMP4 is a peripherally-derived factor for motor neurons and attenuates glutamate-induced excitotoxicity in vitro. *PLoS ONE* 8: e58441
- Chou J, Harvey BK, Ebendal T, Hoffer B, Wang Y. 2008. Nigrostriatal alterations in bone morphogenetic protein receptor II dominant negative mice. *Acta neurochirurgica. Supplement* 101: 93-98
- Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, et al. 2001. Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nature medicine* 7: 1144
- Ciani L, Krylova O, Smalley MJ, Dale TC, Salinas PC. 2004. A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules. *The Journal of Cell Biology* 164: 243-53
- Ciani L, Salinas PC. 2005. Signalling in neural development: WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 351-62
- Colombrita C, Zennaro E, Fallini C, Weber M, Sommacal A, et al. 2009. TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *Journal of Neurochemistry* 111: 1051-61
- Crippa V, Sau D, Rusmini P, Boncoraglio A, Onesto E, et al. 2010. The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Human Molecular Genetics* 19: 3440-56
- Crosio C, Casciati A, Iaccarino C, Rotilio G, Carrì MT. 2006. Bcl2a1 serves as a switch in death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death And Differentiation* 13: 2150
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. 2004. Impaired Degradation of Mutant α -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* 305: 1292-95
- Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D. 2010. The “Dying-Back” Phenomenon of Motor Neurons in ALS. *Journal of Molecular Neuroscience* 43: 470-77
- David MD, Yeramian A, Duñach M, Llovera M, Cantí C, et al. 2008. Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential β -catenin phosphorylation. *Journal of Cell Science* 121: 2718-30

- Davis EK, Zou Y, Ghosh A. 2008. Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. *Neural Development* 3: 32
- De Ferrari GV, Chacón MA, Barría MI, Garrido JL, Godoy JA, et al. 2003. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by β -amyloid fibrils. *Molecular Psychiatry* 8: 195-208
- De Ferrari GV, Inestrosa NC. 2000. Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain research reviews* 33: 1-12
- de Oliveira GP, Maximino JR, Maschietto M, Zanoteli E, Puga RD, et al. 2014. Early Gene Expression Changes in Skeletal Muscle from SOD1 G93A Amyotrophic Lateral Sclerosis Animal Model. *Cellular and Molecular Neurobiology* 34: 451-62
- DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, Simmons MV, Poueymirou WT, et al. 1996. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85: 501-12
- Demireva EY, Shapiro LS, Jessell TM, Zampieri N. 2011. Motor pool position and target topography regulated by β - and γ -catenin activities. *Cell* 147: 641
- Deng H, Hentati A, Tainer J, Iqbal Z, Cayabyab A, et al. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261: 1047-51
- Deshpande M, Feiger Z, Shilton AK, Luo CC, Silverman E, Rodal AA. 2016. Role of BMP receptor traffic in synaptic growth defects in an ALS model. *Molecular Biology of the Cell* 27: 2898-910
- Dickins EM, Salinas PC. 2013. Wnts in action: from synapse formation to synaptic maintenance. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, et al. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321: 1218-21
- Dobrowolny G. 2005. Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *The Journal of Cell Biology* 168: 193-99
- Dobrowolny G, Aucello M, Musarò A. 2011. Muscle atrophy induced by SOD1G93A expression does not involve the activation of caspase in the absence of denervation. *Skeletal Muscle* 1: 3
- Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, et al. 2008. Skeletal Muscle Is a Primary Target of SOD1G93A-Mediated Toxicity. *Cell Metabolism* 8: 425-36

- Dormann D, Haass C. 2013. Fused in sarcoma (FUS): An oncogene goes awry in neurodegeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience* 56: 475-86
- Drannik A, Martin J, Peterson R, Ma X, Jiang F, Turnbull J. 2017. Cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis inhibits sonic hedgehog function. *PLoS ONE* 12: e0171668
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. 2005. α -catenin is a molecular switch that binds E-cadherin- β -catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123: 903-15
- Dun Y, Yang Y, Xiong Z, Feng M, Zhang Y, et al. 2013. Induction of Dickkopf-1 contributes to the neurotoxicity of MPP⁺ in PC12 cells via inhibition of the canonical Wnt signaling pathway. *Neuropharmacology* 67: 168-75
- Dupuis L, Loeffler J-P. 2009. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Current Opinion in Pharmacology* 9: 341-46
- Durer ZAO, Cohlberg JA, Dinh P, Padua S, Ehrenclou K, et al. 2009. Loss of metal ions, disulfide reduction and mutations related to familial ALS promote formation of amyloid-like aggregates from superoxide dismutase. *PLoS ONE* 4: e5004
- Eaton BA, Davis GW. 2005. LIM Kinase1 controls synaptic stability downstream of the type II BMP receptor. *Neuron* 47: 695-708
- Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, et al. 2012. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Science Translational Medicine* 4: 145ra04-45ra04
- Elghetany MT, Saleem A. 1988. Methods for Staining Amyloid in Tissues: A Review. *Stain Technology* 63: 201-12
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessell TM. 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87: 661-73
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, et al. 1997. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90: 169-80
- Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T. 1992a. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256: 1555-60
- Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T. 1992b. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256: 1555-60

- Farías GG, Alfaro IE, Cerpa W, Grabowski CP, Godoy JA, et al. 2009. Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry* 284: 15857-66
- Fernández-Martos CM, González-Fernández C, González P, Maqueda A, Arenas E, Rodríguez FJ. 2011. Differential expression of Wnts after spinal cord contusion injury in adult rats. *PLoS ONE* 6: e27000
- Ferraro E, Molinari F, Berghella L. 2012. Molecular control of neuromuscular junction development. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 3: 13-23
- Finley MF, Devata S, Huettner JE. 1999. BMP-4 inhibits neural differentiation of murine embryonic stem cells. *Journal of neurobiology* 40: 271-87
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, et al. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185: 232-40
- Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, et al. 2008. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 2052-57
- Forsberg K, Jonsson PA, Andersen PM, Bergemalm D, Graffmo KS, et al. 2010. Novel Antibodies Reveal Inclusions Containing Non-Native SOD1 in Sporadic ALS Patients. *PLoS ONE* 5: e11552
- Fox MA, Umemori H. 2006. Seeking long-term relationship: axon and target communicate to organize synaptic differentiation. *J Neurochem* 97: 1215-31
- Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. 2000. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20: 2534-42
- Fu AK, Cheung ZH, Ip NY. 2008. β -catenin in reverse action. *Nature Neuroscience* 11: 244
- Fukada K, Zhang F, Vien A, Cashman NR, Zhu H. 2004. Mitochondrial Proteomic Analysis of a Cell Line Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3: 1211-23
- Furukawa Y, Kaneko K, Yamanaka K, O'Halloran TV, Nukina N. 2008. Complete Loss of Post-translational Modifications Triggers Fibrillar Aggregation of SOD1 in the Familial Form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Biological Chemistry* 283: 24167-76
- Galli S, Lopes DM, Ammari R, Kopra J, Millar SE, et al. 2014. Deficient Wnt signalling triggers striatal synaptic degeneration and impaired motor behaviour in adult mice. *Nature communications* 5: 4992

- Gan W-B, Lichtman JW. 1998. Synaptic segregation at the developing neuromuscular junction. *Science* 282: 1508-11
- Garcia-Mata R, Gao YS, Sztul E. 2002. Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes. *Traffic* 3: 388-96
- Garrido JL, GODOY JA, Alvarez A, Bronfman M, Inestrosa NC. 2002. Protein kinase C inhibits amyloid β peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. *The FASEB Journal* 16: 1982-84
- Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, et al. 1996. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85: 525-35
- Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, et al. 1995. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377: 232
- Ghanevati M, Miller CA. 2005. Phospho- β -catenin accumulation in Alzheimer's disease and in aggresomes attributable to proteasome dysfunction. *Journal of Molecular Neuroscience* 25: 79-94
- Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, et al. 2014. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology* 112: 24-49
- Glass DJ, Bowen DC, Stitt TN, Radziejewski C, Bruno J, et al. 1996. Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85: 513-23
- Glass DJ, Yancopoulos GD. 1997. Sequential roles of agrin, MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Current Opinion in Neurobiology* 7: 379-84
- Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang Y-L, Kazanskaya O, et al. 2011. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO reports* 12: 1055-61
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391: 357
- Godin JD, Poizat G, Hickey MA, Maschat F, Humbert S. 2010. Mutant huntingtin-impaired degradation of β -catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *The EMBO Journal* 29: 2433-45
- Gomes C, Escrevente C, Costa J. 2010. Mutant superoxide dismutase 1 overexpression in NSC-34 cells: Effect of trehalose on aggregation, TDP-43 localization and levels of co-expressed glycoproteins. *Neuroscience Letters* 475: 145-49

- Gomes C, Palma AS, Almeida R, Regalla M, McCluskey LF, et al. 2008. Establishment of a cell model of ALS disease: Golgi apparatus disruption occurs independently from apoptosis. *Biotechnology Letters* 30: 603-10
- Gonzalez-Fernandez C, Arevalo-Martin A, Paniagua-Torija B, Ferrer I, Rodriguez FJ, Garcia-Ovejero D. 2016. Wnts Are Expressed in the Ependymal Region of the Adult Spinal Cord. *Molecular Neurobiology*: 1-14
- González-Fernández C, Fernández-Martos CM, Shields SD, Arenas E, Javier Rodríguez F. 2014. Wnts are expressed in the spinal cord of adult mice and are differentially induced after injury. *Journal of neurotrauma* 31: 565-81
- González-Fernández C, Mancuso R, del Valle J, Navarro X, Rodríguez FJ. 2016. Wnt signaling alteration in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice: special focus on frizzled-5 cellular expression pattern. *PLoS ONE* 11: e0155867
- Gonzalez P, Fernandez-Martos CM, Gonzalez-Fernandez C, Arenas E, Rodriguez FJ. 2012. Spatio-temporal expression pattern of frizzled receptors after contusive spinal cord injury in adult rats. *PLoS ONE* 7: e50793
- Goodall EF, Morrison KE. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease): proposed mechanisms and pathways to treatment. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 8: 1-22
- Gordon MD, Nusse R. 2006. Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry* 281: 22429-33
- Gratacos E, Checa N, Alberch J. 2001. Bone morphogenetic protein-2, but not bone morphogenetic protein-7, promotes dendritic growth and calbindin phenotype in cultured rat striatal neurons. *Neuroscience* 104: 783-90
- Green KJ, Getsios S, Troyanovsky S, Godsel L. 2010. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a000125
- Guégan C, Przedborski S. 2003. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 111: 153-61
- Gurney M, Pu H, Chiu A, Dal Canto M, Polchow C, et al. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264: 1772-75
- Hampton DW, Asher RA, Kondo T, Steeves JD, Ramer MS, Fawcett JW. 2007. A potential role for bone morphogenetic protein signalling in glial cell fate determination following adult central nervous system injury in vivo. *European Journal of Neuroscience* 26: 3024-35
- Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N. 2002. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* 158: 541-49

- Harvey B, Mark A, Chou J, Chen G, Hoffer B, Wang Y. 2004. Neurotrophic effects of bone morphogenetic protein-7 in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Research* 1022: 88-95
- Hayashi Y, Homma K, Ichijo H. 2016. SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Advances in Biological Regulation* 60: 95-104
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131: 1663-77
- Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. 2009. Microglia in ALS: The Good, The Bad, and The Resting. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 4: 389-98
- Henríquez JP, Krull CE, Osses N. 2011. The Wnt and BMP Families of Signaling Morphogens at the Vertebrate Neuromuscular Junction. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 8924-46
- Henriquez JP, Salinas PC. 2012. Dual roles for Wnt signalling during the formation of the vertebrate neuromuscular junction. *Acta Physiol (Oxf)* 204: 128-36
- Henriquez JP, Webb A, Bence M, Bildsoe H, Sahores M, et al. 2008. Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 18812-17
- Hetz C, Mollereau B. 2014. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 15: 233
- Hetz C, Thielen P, Fisher J, Pasinelli P, Brown RH, et al. 2007. The proapoptotic BCL-2 family member BIM mediates motoneuron loss in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death And Differentiation* 14: 1386
- Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, et al. 2009. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes & Development* 23: 2294-306
- Heuberger J, Birchmeier W. 2010. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a002915
- Higgins CMJ, Jung C, Xu Z. 2003. ALS-associated mutant SOD1(G93A) causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neuroscience* 4: 16-16
- Hirth F. 2010. Drosophila melanogaster in the study of human neurodegeneration. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 9: 504-23

- Horbinski C, Stachowiak E, Chandrasekaran V, Miuzukoshi E, Higgins D, Stachowiak M. 2002. Bone morphogenetic protein-7 stimulates initial dendritic growth in sympathetic neurons through an intracellular fibroblast growth factor signaling pathway. *Journal of Neurochemistry* 80: 54-63
- Hsieh J-C, Kodjabachian L, Rebert ML, Rattner A, Smallwood PM, et al. 1999. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398: 431
- Iaccarino C, Mura ME, Esposito S, Carta F, Sanna G, et al. 2011. Bcl2-A1 interacts with pro-caspase-3: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 43: 642-50
- Inestrosa NC, Arenas E. 2010. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci* 11: 77-86
- Inestrosa NC, Reyes AE, Chacón MA, Cerpa W, Villalón A, et al. 2005. Human-like rodent amyloid- β -peptide determines Alzheimer pathology in aged wild-type *Octodon degu*. *Neurobiology of aging* 26: 1023-28
- Inestrosa NC, Ríos JA, Cisternas P, Tapia-Rojas C, Rivera DS, et al. 2015. Age progression of neuropathological markers in the brain of the Chilean rodent *Octodon degus*, a natural model of Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 25: 679-91
- Inestrosa NC, Toledo EM. 2008. The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurodegeneration* 3: 9
- Ip P, Mulligan VK, Chakrabarty A. 2011. ALS-causing SOD1 mutations promote production of copper-deficient misfolded species. *Journal of molecular biology* 409: 839-52
- Isobe T, Tooi N, Nakatsuji N, Aiba K. 2015. Amyotrophic lateral sclerosis models derived from human embryonic stem cells with different superoxide dismutase 1 mutations exhibit differential drug responses. *Stem cell research* 15: 459-68
- Iwasaki S, Iguchi M, Watanabe K, Hoshino R, Tsujimoto M, Kohno M. 1999. Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *Journal of Biological Chemistry* 274: 26503-10
- Jaarsma D, Teuling E, Haasdijk ED, De Zeeuw CI, Hoogenraad CC. 2008. Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase Is Sufficient to Induce Amyotrophic Lateral Sclerosis in Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience* 28: 2075-88
- Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. 2012. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science (New York, N.Y.)* 337: 59-64

- Jang YC, Van Remmen H. 2011. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Experimental Gerontology* 46: 193-98
- Jazi MS, Najafi SMA. 2017. Beta-catenin forms protein aggregation at high concentrations in HEK293TCells. *Iranian journal of medical sciences* 42: 66
- Jiang M, Schuster JE, Fu R, Siddique T, Heckman C. 2009. Progressive changes in synaptic inputs to motoneurons in adult sacral spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience* 29: 15031-38
- Jing L, Lefebvre JL, Gordon LR, Granato M. 2009. Wnt signals organize synaptic prepattern and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor. *Neuron* 61: 721-33
- Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. 2000. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 12571-76
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143: 1883-98
- Jurata LW, Thomas JB, Pfaff SL. 2000. Transcriptional mechanisms in the development of motor control. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 72-79
- Katsuno M, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. 2011. Transforming growth factor- β signaling in motor neuron diseases. *Current molecular medicine* 11: 48-56
- Kaus A, Sareen D. 2015. ALS patient stem cells for unveiling disease signatures of motoneuron susceptibility: perspectives on the deadly mitochondria, ER stress and calcium triad. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 448
- Kawano Y, Kypta R. 2003. *Kawano Y, Kypta R Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J Cell Sci* 116: 2627-2634. 2627-34 pp.
- Kedersha N, Anderson P. 2007. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods in enzymology* 431: 61-81
- Kelly CE, Thymiakou E, Dixon JE, Tanaka S, Godwin J, Episkopou V. 2013. Rnf165/Ark2C enhances BMP-Smad signaling to mediate motor axon extension. *PLoS Biology* 11: e1001538
- Kerman A, Liu H-N, Croul S, Bilbao J, Rogaeva E, et al. 2010. *Amyotrophic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in which extensive misfolding of SOD1 is unique to the familial form.* 335-44 pp.

- Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, et al. 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377: 942-55
- Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, Hallock PT, Gomez AM, et al. 2008. Lrp4 Is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK. *Cell* 135: 334-42
- Kiskinis E, Sandoe J, Williams LA, Boulting GL, Moccia R, et al. 2014. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell* 14: 781-95
- Kopito RR. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology* 10: 524-30
- Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. 2010. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters* 584: 1393-98
- Koval A, Katanaev VL. 2011. Wnt3a stimulation elicits G-protein-coupled receptor properties of mammalian Frizzled proteins. *Biochemical Journal* 433: 435-40
- Kummer TT, Misgeld T, Lichtman JW, Sanes JR. 2004. Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus. *The Journal of Cell Biology* 164: 1077-87
- Kummer TT, Misgeld T, Sanes JR. 2006. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Current Opinion in Neurobiology* 16: 74-82
- Kuo J, Lee R, Zhang L, Heckman C. 2006. Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurones. *The Journal of Physiology* 574: 819-34
- Kuo J, Siddique T, Fu R, Heckman C. 2005. Increased persistent Na⁺ current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *The Journal of Physiology* 563: 843-54
- Kuo JJ, Schonewille M, Siddique T, Schults AN, Fu R, et al. 2004. Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *Journal of Neurophysiology* 91: 571-75
- Kurimoto S, Jung J, Tapadia M, Lengfeld J, Agalliu D, et al. 2015. Activation of the Wnt/ β -catenin signaling cascade after traumatic nerve injury. *Neuroscience* 294: 101-08
- Kwiatkowski TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, et al. 2009. Mutations in the *FUS/TLS* Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 323: 1205-08

- L'Episcopo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, et al. 2011. Reactive astrocytes and Wnt/ β -catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 41: 508-27
- Lacomblez L, Bensimon G, Meininger V, Leigh PN, Guillet P, Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study G, II. 1996. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet* 347: 1425-31
- Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. 2010. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics* 19: R46-R64
- Lanuza MA, Garcia N, Santafe M, Gonzalez CM, Alonso I, et al. 2002. Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C. *J Neurosci Res* 67: 607-17
- Leal SS, Cardoso I, Valentine JS, Gomes CM. 2013. Calcium Ions Promote Superoxide Dismutase 1 (SOD1) Aggregation into Non-fibrillar Amyloid A LINK TO TOXIC EFFECTS OF CALCIUM OVERLOAD IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)? *Journal of Biological Chemistry* 288: 25219-28
- Leblond CS, Kaneb HM, Dion PA, Rouleau GA. 2014. Dissection of genetic factors associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology* 262: 91-101
- Lee-Hoeflich ST, Causing CG, Podkowa M, Zhao X, Wrana JL, Attisano L. 2004. Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *The EMBO Journal* 23: 4792-801
- Lee K-W, Kim H-J, Sung J-J, Park K-S, Kim M. 2002. Defective neurite outgrowth in aphidicolin/cAMP-induced motor neurons expressing mutant Cu/Zn superoxide dismutase. *International Journal of Developmental Neuroscience* 20: 521-26
- Li B, Xu W, Luo C, Gozal D, Liu R. 2003. VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death. *Molecular Brain Research* 111: 155-64
- Li L, Zhang X, Le W. 2008a. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy* 4: 290-93
- Li W, Brakefield D, Pan Y, Hunter D, Myckatyn TM, Parsadanian A. 2007. Muscle-derived but not centrally derived transgene GDNF is neuroprotective in G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Experimental Neurology* 203: 457-71
- Li X-M, Dong X-P, Luo S-W, Zhang B, Lee D-H, et al. 2008b. Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle β -catenin. *Nature Neuroscience* 11: 262-68

- Li X, Guan Y, Chen Y, Zhang C, Shi C, et al. 2013a. Expression of Wnt5a and its receptor Fzd2 is changed in the spinal cord of adult amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *International journal of clinical and experimental pathology* 6: 1245
- Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. 2013b. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *The Journal of Cell Biology* 201: 361-72
- Libro R, Bramanti P, Mazzon E. 2016. The role of the Wnt canonical signaling in neurodegenerative diseases. *Life Sciences* 158: 78-88
- Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee K-F. 2001. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410: 1057
- Lin W, Dominguez B, Yang J, Aryal P, Brandon EP, et al. 2005. Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron* 46: 569-79
- Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang Y-J, Vanderwyde T, Citro A, et al. 2010. Tar DNA Binding Protein-43 (TDP-43) Associates with Stress Granules: Analysis of Cultured Cells and Pathological Brain Tissue. *PLoS ONE* 5: e13250
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, et al. 2002. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108: 837-47
- Liu XS, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Meng H, Chopp M. 2007. Comparison of in vivo and in vitro gene expression profiles in subventricular zone neural progenitor cells from the adult mouse after middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* 146: 1053-61
- Logan CY, Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810
- López-Rovira T, Chaux E, Massagué J, Rosa JL, Ventura F. 2002. Direct Binding of Smad1 and Smad4 to Two Distinct Motifs Mediates Bone Morphogenetic Protein-specific Transcriptional Activation of Id1 Gene. *Journal of Biological Chemistry* 277: 3176-85
- Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D. 2004. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119: 97-108
- Lunn JS, Sakowski SA, Kim B, Rosenberg AA, Feldman EL. 2009. Vascular endothelial growth factor prevents G93A-SOD1-induced motor neuron degeneration. *Developmental Neurobiology* 69: 871-84
- Luo ZG, Wang Q, Zhou JZ, Wang J, Luo Z, et al. 2002. Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron* 35: 489-505

- Ma X, Turnbull P, Peterson R, Turnbull J. 2013. Trophic and proliferative effects of Shh on motor neurons in embryonic spinal cord culture from wildtype and G93A SOD1 mice. *BMC Neuroscience* 14: 119
- MacDonald BT, He X. 2012. Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ β -catenin signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: a007880
- Maekawa S, Leigh PN, King A, Jones E, Steele JC, et al. 2009. TDP-43 is consistently co-localized with ubiquitinated inclusions in sporadic and Guam amyotrophic lateral sclerosis but not in familial amyotrophic lateral sclerosis with and without SOD1 mutations. *Neuropathology* 29: 672-83
- Magrane J, Hervias I, Henning MS, Damiano M, Kawamata H, Manfredi G. 2009. Mutant SOD1 in neuronal mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities. *Human Molecular Genetics* 18: 4552-64
- Maier O, Böhm J, Dahm M, Brück S, Beyer C, Johann S. 2013. Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochemistry International* 62: 1029-38
- Mancuso R, Navarro X. 2015. Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Progress in Neurobiology* 133: 1-26
- Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stanek P, et al. 2001. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411: 321
- Marchetti B, L'episcopo F, Morale MC, Tirolo C, Testa N, et al. 2013. Uncovering novel actors in astrocyte–neuron crosstalk in Parkinson's disease: the Wnt/ β -catenin signaling cascade as the common final pathway for neuroprotection and self-repair. *European Journal of Neuroscience* 37: 1550-63
- Marcuzzo S, Zucca I, Mastropietro A, de Rosbo NK, Cavalcante P, et al. 2011. Hind limb muscle atrophy precedes cerebral neuronal degeneration in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: A longitudinal MRI study. *Experimental Neurology* 231: 30-37
- Mardones MD, Andaur GA, Varas-Godoy M, Henriquez JF, Salech F, et al. 2016. Frizzled-1 receptor regulates adult hippocampal neurogenesis. *Molecular Brain* 9: 29
- Markossian K, Kurganov B. 2004. Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes. *Biochemistry (Moscow)* 69: 971-84
- Marqués G, Bao H, Haerry TE, Shimell MJ, Duchek P, et al. 2002. The Drosophila BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function. *Neuron* 33: 529-43

- Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW. 2000. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J Neurosci* 20: 3663-75
- Marzo A, Galli S, Lopes D, McLeod F, Podpolny M, et al. 2016. Reversal of synapse degeneration by restoring Wnt signaling in the adult hippocampus. *Current Biology* 26: 2551-61
- Matsuura I, Endo M, Hata K, Kubo T, Yamaguchi A, et al. 2007. BMP inhibits neurite growth by a mechanism dependent on LIM-kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360: 868-73
- Matsuura I, Taniguchi J, Hata K, Saeki N, Yamashita T. 2008. BMP inhibition enhances axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry* 105: 1471-79
- McEwen DG, Peifer M. 2000. Wnt signaling: Moving in a new direction. *Current Biology* 10: R562-R64
- Messéant J, Dobbertin A, Girard E, Delers P, Manuel M, et al. 2015. MuSK frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance. *Journal of Neuroscience* 35: 4926-41
- Mii Y, Taira M. 2011. Secreted Wnt “inhibitors” are not just inhibitors: Regulation of extracellular Wnt by secreted Frizzled-related proteins. *Development, Growth & Differentiation* 53: 911-23
- Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. 2012. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND).
- Misgeld T, Burgess RW, Lewis RM, Cunningham JM, Lichtman JW, Sanes JR. 2002. Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* 36: 635-48
- Misgeld T, Kummer TT, Lichtman JW, Sanes JR. 2005. Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11088-93
- Miyagi M, Mikawa S, Sato T, Hasegawa T, Kobayashi S, et al. 2012. BMP2, BMP4, noggin, BMPRIA, BMPRIIB, and BMPRII are differentially expressed in the adult rat spinal cord. *Neuroscience* 203: 12-26
- Moon RT, Kohn AD, Ferrari GVD, Kaykas A. 2004. WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nature Reviews Genetics* 5: 691-701

- Moransard M, Borges LS, Willmann R, Marangi PA, Brenner HR, et al. 2003. Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering. *Journal of Biological Chemistry* 278: 7350-59
- Moreno-Gonzalez I, Soto C. *Seminars in cell & developmental biology* 2011, 22: 482-87. Elsevier.
- Morohoshi F, Arai K, Takahashi E-i, Tanigami A, Ohki M. 1996. Cloning and Mapping of a HumanRBP56Gene Encoding a Putative RNA Binding Protein Similar to FUS/TLS and EWS Proteins. *Genomics* 38: 51-57
- Mourelatos Z, Gonatas NK, Stieber A, Gurney ME, Dal Canto MC. 1996. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu, Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 5472-77
- Munoz DG, Greene C, Perl DP, Selkoe DJ. 1988. Accumulation of Phosphorylated Neurofilaments in Anterior Horn Motoneurons of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 47: 9-18
- Musarò A. 2010. State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis. *World Journal of Biological Chemistry* 1: 62
- Nassif M, Matus S, Castillo K, Hetz C. 2010. Amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a journey through the secretory pathway. *Antioxidants & redox signaling* 13: 1955-89
- Nichols AS, Floyd DH, Bruinsma SP, Narzinski K, Baranski TJ. 2013. Frizzled receptors signal through G proteins. *Cellular Signalling* 25: 1468-75
- Nishimura M, Yu G, Levesque G, Zhang D, Ruel L, et al. 1999. Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of β -catenin, a component of the presenilin protein complex. *Nature medicine* 5: 164
- Nordström U, Maier E, Jessell TM, Edlund T. 2006. An early role for WNT signaling in specifying neural patterns of Cdx and Hox gene expression and motor neuron subtype identity. *PLoS Biology* 4: e252
- Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, et al. 2003. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes to Cells* 8: 645-54
- Oliva CA, Montecinos-Oliva C, Inestrosa NC. 2018. Wnt signaling in the Central Nervous System: New Insights in Health and Disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*
- Oliva CA, Vargas JY, Inestrosa NC. 2013. Wnt signaling: role in LTP, neural networks and memory. *Ageing Research Reviews* 12: 786-800

- Onesto E, Rusmini P, Crippa V, Ferri N, Zito A, et al. 2011. Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry* 118: 266-80
- Osses N, Henríquez JP. 2015. Bone morphogenetic protein signaling in vertebrate motor neurons and neuromuscular communication. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 453
- Pan T, Kondo S, Zhu W, Xie W, Jankovic J, Le W. 2008. Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiology of Disease* 32: 16-25
- Panchision DM, Pickel JM, Studer L, Lee S-H, Turner PA, et al. 2001. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes & Development* 15: 2094-110
- Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, et al. 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447: 860
- Pansarasa O, Rossi D, Berardinelli A, Cereda C. 2013. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Skeletal Muscle: An Update. *Molecular Neurobiology* 49: 984-90
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, et al. 2004. Amyotrophic Lateral Sclerosis-Associated SOD1 Mutant Proteins Bind and Aggregate with Bcl-2 in Spinal Cord Mitochondria. *Neuron* 43: 19-30
- Pasinelli P, Borchelt DR, Houseweart MK, Cleveland DW, Brown RH. 1998. Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15763-68
- Pasinelli P, Brown RH. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature Reviews Neuroscience* 7: 710-23
- Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Cleveland DW. 2000. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 13901-06
- Patapoutian A, Reichardt LF. 2000. Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 392-99
- Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, et al. 2006. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* 124: 1255-68

- Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR. 1997. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *The Journal of Cell Biology* 139: 1507-21
- Pedrini S, Sau D, Guareschi S, Bogush M, Brown RH, et al. 2010. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Human Molecular Genetics* 19: 2974-86
- Peifer M, Polakis P. 2000. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287: 1606-09
- Peljto M, Dasen JS, Mazzoni EO, Jessell TM, Wichterle H. 2010. Functional diversity of ESC-derived motor neuron subtypes revealed through intraspinal transplantation. *Cell Stem Cell* 7: 355-66
- Peretto P, Dati C, De Marchis S, Kim H, Ukhanova M, et al. 2004. Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience* 128: 685-96
- Pérez-García María J, Burden Steven J. 2012. Increasing MuSK Activity Delays Denervation and Improves Motor Function in ALS Mice. *Cell Reports* 2: 497-502
- Peterson R, Turnbull J. 2012. Sonic hedgehog is cytoprotective against oxidative challenge in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience* 47: 31-41
- Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, Edlund T, Jessell TM. 1996a. Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84: 309-20
- Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, Edlund T, Jessell TM. 1996b. Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84: 309-20
- Phukan J, Hardiman O. 2009. The management of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology* 256: 176
- Pinto C, Cardenas P, Osses N, Henriquez JP. 2013. Characterization of Wnt/beta-catenin and BMP/Smad signaling pathways in an in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 7: 239
- Pizzasegola C, Caron I, Daleno C, Ronchi A, Minoia C, et al. 2009. Treatment with lithium carbonate does not improve disease progression in two different strains of SOD1 mutant mice. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* 10: 221-28
- Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, Bennett CF, Cleveland DW, Yeo GW. 2012. Misregulated RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research* 1462: 3-15

- Price SR, Garcia NVDM, Ranscht B, Jessell TM. 2002. Regulation of motor neuron pool sorting by differential expression of type II cadherins. *Cell* 109: 205-16
- Prudencio M, Durazo A, Whitelegge JP, Borchelt DR. 2010. An examination of wild-type SOD1 in modulating the toxicity and aggregation of ALS-associated mutant SOD1. *Human Molecular Genetics* 19: 4774-89
- Purro SA, Dickins EM, Salinas PC. 2012. The secreted Wnt antagonist Dickkopf-1 is required for amyloid β -mediated synaptic loss. *Journal of Neuroscience* 32: 3492-98
- Purro SA, Galli S, Salinas PC. 2014. Dysfunction of Wnt signaling and synaptic disassembly in neurodegenerative diseases. *Journal of Molecular Cell Biology* 6: 75-80
- Quinlan K, Schuster J, Fu R, Siddique T, Heckman C. 2011. Altered postnatal maturation of electrical properties in spinal motoneurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Physiology* 589: 2245-60
- Quiroz JA, Machado-Vieira R, Zarate Jr CA, Manji HK. 2010. Novel insights into lithium's mechanism of action: neurotrophic and neuroprotective effects. *Neuropsychobiology* 62: 50-60
- Qureshi HY, Li T, MacDonald R, Cho CM, Leclerc N, Paudel HK. 2013. Interaction of 14-3-3 ζ with Microtubule-Associated Protein Tau within Alzheimer's Disease Neurofibrillary Tangles. *Biochemistry* 52: 6445-55
- Ratnaparkhi A, Lawless GM, Schweizer FE, Golshani P, Jackson GR. 2008. A Drosophila model of ALS: human ALS-associated mutation in VAP33A suggests a dominant negative mechanism. *PLoS ONE* 3: e2334
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, et al. 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genetics* 13: 43
- Riddoch-Contreras J, Yang S-Y, Dick JR, Goldspink G, Orrell RW, Greensmith L. 2009. Mechano-growth factor, an IGF-I splice variant, rescues motoneurons and improves muscle function in SOD1G93A mice. *Experimental Neurology* 215: 281-89
- Rinaldi F, Hartfield E, Crompton L, Badger J, Glover C, et al. 2015. Cross-regulation of Connexin43 and β -catenin influences differentiation of human neural progenitor cells. *Cell death & disease* 5: e1017
- Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW. 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 689-93

- Rivera DS, Inestrosa NC, Bozinovic F. 2016a. On cognitive ecology and the environmental factors that promote Alzheimer disease: lessons from *Octodon degus* (Rodentia: Octodontidae). *Biological research* 49: 10
- Rivera DS, Lindsay C, Codocedo JF, Morel I, Pinto C, et al. 2016b. Andrographolide recovers cognitive impairment in a natural model of Alzheimer's disease (*Octodon degus*). *Neurobiology of aging* 46: 204-20
- Robberecht W, Philips T. 2013. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 14: 248-64
- Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastião AM, Ribeiro JA. 2013. Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1 (G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS ONE* 8: e73846
- Romanes G. 1964. The motor pools of the spinal cord. In *Progress in brain research*, pp. 93-119: Elsevier
- Rosen DR. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364: 362
- Rosi MC, Luccarini I, Grossi C, Fiorentini A, Spillantini MG, et al. 2010. Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease. *Journal of Neurochemistry* 112: 1539-51
- Ross CA, Poirier MA. 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* 10: S10
- Ryu H-H, Jun M-H, Min K-J, Jang D-J, Lee Y-S, et al. 2014. Autophagy regulates amyotrophic lateral sclerosis-linked fused in sarcoma-positive stress granules in neurons. *Neurobiology of aging* 35: 2822-31
- Säfholm A, Leandersson K, Dejmek J, Nielsen CK, Villoutreix BO, Andersson T. 2006. A formylated hexapeptide ligand mimics the ability of Wnt-5a to impair migration of human breast epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 281: 2740-49
- Salinas PC. 2012. Wnt signaling in the vertebrate central nervous system: from axon guidance to synaptic function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4: a008003
- Salinas PC. 2013. Wnts in action: from synapse formation to synaptic maintenance. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 162
- Salinas PC, Zou Y. 2008. Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu. Rev. Neurosci.* 31: 339-58

- Samuel MA, Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Sanes JR. 2012. Agrin and synaptic laminin are required to maintain adult neuromuscular junctions. *PLoS ONE* 7: e46663
- Sances S, Bruijn LI, Chandran S, Eggan K, Ho R, et al. 2016. Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nature Neuroscience* 19: 542
- Sanes JR, Lichtman JW. 1999. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22: 389-442
- Sanes JR, Lichtman JW. 2001. Development: Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 791
- Sathasivam S, Grierson AJ, Shaw PJ. 2005. Characterization of the caspase cascade in a cell culture model of SOD1-related familial amyotrophic lateral sclerosis: expression, activation and therapeutic effects of inhibition. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 31: 467-85
- Sathasivam S, Ince PG, Shaw PJ. 2001. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 27: 257-74
- Saxena M, Agnihotri N, Sen J. 2018. Perturbation of canonical and non-canonical BMP signaling affects migration, polarity and dendritogenesis of mouse cortical neurons. *Development* 145: dev147157
- Saxena S, Caroni P. 2011. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron* 71: 35-48
- Schulte G, Bryja V. 2007. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* 28: 518-25
- Schymick JC, Talbot K, Traynor BJ. 2007. Genetics of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2: R233-42
- Serrano FG, Tapia-Rojas C, Carvajal FJ, Hancke J, Cerpa W, Inestrosa NC. 2014. Andrographolide reduces cognitive impairment in young and mature A β PP^{swe}/PS-1 mice. *Molecular Neurodegeneration* 9: 61
- Setoguchi T, Nakashima K, Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, et al. 2004. Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Experimental Neurology* 189: 33-44
- Setoguchi T, Yone K, Matsuoka E, Takenouchi H, Nakashima K, et al. 2001. Traumatic injury-induced BMP7 expression in the adult rat spinal cord. *Brain Research* 921: 219-25

- Shankar GM, Walsh DM. 2009. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . *Molecular Neurodegeneration* 4: 48
- Sharma SK, Wallace BG. 2003. Lithium inhibits a late step in agrin-induced AChR aggregation. *Journal of Neurobiology* 54: 346-57
- Shi L, Fu AK, Ip NY. 2012. Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* 35: 441-53
- Shi Y, Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113: 685-700
- Si Y, Cui X, Kim S, Wians R, Sorge R, et al. 2014. Smads as muscle biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of clinical and translational neurology* 1: 778-87
- Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 20: 343-55
- Song Y, Balice-Gordon R. 2008. New dogs in the dogma: Lrp4 and Tid1 in neuromuscular synapse formation. *Neuron* 60: 526-28
- Soto C. 2003. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 49
- Stieber A, Gonatas J, Moore J, Bantly A, Yim H-S, et al. 2004. Disruption of the structure of the Golgi apparatus and the function of the secretory pathway by mutants G93A and G85R of Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 219: 45-53
- Stranks SD, Ecroyd H, Van Sluyter S, Waters EJ, Carver JA, Von Smekal L. 2009. Model for amorphous aggregation processes. *Physical Review E* 80: 051907
- Strochlic L, Falk J, Goillot E, Sigoillot S, Bourgeois F, et al. 2012. Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction. *PLoS ONE* 7: e29976
- Strong MJ, Hudson AJ, Alvord WG. 1991. Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, 1850-1989: A Statistical Analysis of the World Literature. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques* 18: 45-58
- Takalo M, Salminen A, Soininen H, Hiltunen M, Haapasalo A. 2013. Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *American Journal of Neurodegenerative Disease* 2: 1-14

- Tanabe Y, Jessell TM. 1996. Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274: 1115-23
- Tanabe Y, Williams C, Jessell TM. 1998. Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* 95: 67-80
- Tapia-Rojas C, Schüller A, Lindsay CB, Ureta RC, Mejías-Reyes C, et al. 2015. Andrographolide activates the canonical Wnt signalling pathway by a mechanism that implicates the non-ATP competitive inhibition of GSK-3 β : autoregulation of GSK-3 β in vivo. *Biochemical Journal* 466: 415-30
- Tapia-Rojas C, Burgos PV, Inestrosa NC. 2016. Inhibition of Wnt signaling induces amyloidogenic processing of amyloid precursor protein and the production and aggregation of Amyloid- β (A β) 42 peptides. *Journal of Neurochemistry* 139: 1175-91
- Tarragon E, Lopez D, Estrada C, Ana GC, Schenker E, et al. 2013. Octodon degus: a model for the cognitive impairment associated with Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19: 643-48
- Thonhoff JR, Ojeda L, Wu P. 2009. Stem cell-derived motor neurons: applications and challenges in amyotrophic lateral sclerosis. *Current stem cell research & therapy* 4: 178-99
- Thor S, Ericson J, Brännström T, Edlund T. 1991. The homeodomain LIM protein Isl-1 is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat. *Neuron* 7: 881-89
- Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, et al. 2011. E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *BioMed Research International* 2011
- Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC. 2008. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Progress in Neurobiology* 86: 281-96
- Toli D, Buttigieg D, Blanchard S, Lemonnier T, d'Incamps BL, et al. 2015. Modeling amyotrophic lateral sclerosis in pure human iPSc-derived motor neurons isolated by a novel FACS double selection technique. *Neurobiology of Disease* 82: 269-80
- Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, et al. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *The Journal of Cell Biology* 160: 823-31
- Trosko JE, Chang C-C, Wilson MR, Upham B, Hayashi T, Wade M. 2000. Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. *Methods* 20: 245-64
- Tsuchida T, Ensini M, Morton S, Baldassare M, Edlund T, et al. 1994. Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* 79: 957-70

- Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson GD, Gage FH, et al. 2010. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 14863-68
- Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Fox MA, Sanes JR. 2012. Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS ONE* 7: e34640
- van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, et al. 1997. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* 88: 789-99
- Van Roy F, Berx G. 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 3756-88
- van Zundert B, Izaurieta P, Fritz E, Alvarez FJ. 2012. Early pathogenesis in the adult-onset neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Cellular Biochemistry* 113: 3301-12
- van Zundert B, Peuscher MH, Hynynen M, Chen A, Neve RL, et al. 2008. Neonatal Neuronal Circuitry Shows Hyperexcitable Disturbance in a Mouse Model of the Adult-Onset Neurodegenerative Disease Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience* 28: 10864-74
- van Zundert B, Zhao J-P, Constantine-Paton M. 2010. Synaptic drive at developing synapses: Transient upregulation of kainate receptors. *Developmental Neurobiology* 70: 737-50
- Varela-Nallar L, Arredondo SB, Tapia-Rojas C, Hancke J, Inestrosa NC. 2015. Andrographolide stimulates neurogenesis in the adult hippocampus. *Neural plasticity* 2015
- Varela-Nallar L, Parodi J, Farías GG, Inestrosa NC. 2012a. Wnt-5a Is a Synaptogenic Factor with Neuroprotective Properties against A β Toxicity. *Neurodegenerative Diseases* 10: 23-26
- Varela-Nallar L, Ramirez VT, Gonzalez-Billault C, Inestrosa NC. 2012b. Frizzled receptors in neurons: From growth cones to the synapse. *Cytoskeleton* 69: 528-34
- Vargas JY, Ahumada J, Arrázola MS, Fuenzalida M, Inestrosa NC. 2015. WASP-1, a canonical Wnt signaling potentiator, rescues hippocampal synaptic impairments induced by A β oligomers. *Experimental Neurology* 264: 14-25
- Vargas JY, Fuenzalida M, Inestrosa NC. 2014. In vivo activation of Wnt signaling pathway enhances cognitive function of adult mice and reverses cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Journal of Neuroscience* 34: 2191-202

- Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Moore VDG, Yoshikawa M, et al. 2013a. Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain and Behavior* 3: 335-50
- Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Moore VDG, Yoshikawa M, et al. 2013b. Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain and Behavior* 3: 431-57
- Viñals F, Reiriz J, Ambrosio S, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F. 2004. BMP-2 decreases Mash1 stability by increasing Id1 expression. *The EMBO Journal* 23: 3527-37
- Wang J, Jing Z, Zhang L, Zhou G, Braun J, et al. 2003. Regulation of acetylcholine receptor clustering by the tumor suppressor APC. *Nature Neuroscience* 6: 1017-18
- Wang J, Luo Z-G. 2008. The role of Wnt/ β -catenin signaling in postsynaptic differentiation. *Communicative & integrative biology* 1: 158-60
- Wang J, Ruan N-J, Qian L, Lei W-l, Chen F, Luo Z-G. 2008a. Wnt/ β -Catenin Signaling Suppresses Rapsyn Expression and Inhibits Acetylcholine Receptor Clustering at the Neuromuscular Junction. *Journal of Biological Chemistry* 283: 21668-75
- Wang J, Xu G, Borchelt DR. 2002a. High Molecular Weight Complexes of Mutant Superoxide Dismutase 1: Age-Dependent and Tissue-Specific Accumulation. *Neurobiology of Disease* 9: 139-48
- Wang L-J, Lu Y-Y, Muramatsu S-i, Ikeguchi K, Fujimoto K-i, et al. 2002b. Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience* 22: 6920-28
- Wang L, Sharma K, Deng H-X, Siddique T, Grisotti G, et al. 2008b. Restricted expression of mutant SOD1 in spinal motor neurons and interneurons induces motor neuron pathology. *Neurobiology of Disease* 29: 400-08
- Wang L, Sharma K, Grisotti G, Roos RP. 2009. The effect of mutant SOD1 dismutase activity on non-cell autonomous degeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease* 35: 234-40
- Wang S, Guan Y, Chen Y, Li X, Zhang C, et al. 2013. Role of Wnt1 and Fzd1 in the spinal cord pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis-transgenic mice. *Biotechnology Letters* 35: 1199-207
- Wang Y-L, Wang D-Z, Nie X, Lei D-L, Liu Y-P, et al. 2007a. The role of bone morphogenetic protein-2 in vivo in regeneration of peripheral nerves. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 45: 197-202

- Wang YL, Wang DZ, Nie X, Lei DL, Liu YP, et al. 2007b. The role of bone morphogenetic protein-2 in vivo in regeneration of peripheral nerves. *The British journal of oral & maxillofacial surgery* 45: 197-202
- Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Cizewski Culotta V, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. 2001. Histological Evidence of Protein Aggregation in Mutant SOD1 Transgenic Mice and in Amyotrophic Lateral Sclerosis Neural Tissues. *Neurobiology of Disease* 8: 933-41
- Weston C, Gordon C, Teressa G, Hod E, Ren X-D, Prives J. 2003. Cooperative regulation by Rac and Rho of agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 278: 6450-55
- Weston C, Yee B, Hod E, Prives J. 2000. Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *J Cell Biol* 150: 205-12
- Wijesekera LC, Leigh PN. 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 4: 3
- Wong M, Martin LJ. 2010. Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Human Molecular Genetics* 19: 2284-302
- Wood JD, Beaujeux TP, Shaw PJ. 2003a. Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathology and applied neurobiology* 29: 529-45
- Wood JD, Beaujeux TP, Shaw PJ. 2003b. Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 29: 529-45
- Yabe T, Samuels I, Schwartz JP. 2002. Bone morphogenetic proteins BMP-6 and BMP-7 have differential effects on survival and neurite outgrowth of cerebellar granule cell neurons. *Journal of Neuroscience Research* 68: 161-68
- Yamamoto M, Kobayashi Y, Li M, Niwa H, Mitsuma N, et al. 2001. In vivo gene electroporation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) into skeletal muscle of SOD1 mutant mice. *Neurochemical Research* 26: 1201-07
- Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, et al. 2008. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience* 11: 251-53
- Yang X, Arber S, William C, Li L, Tanabe Y, et al. 2001. Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* 30: 399-410
- Yang Y, Mlodzik M. 2015. Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind (Wnt). *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 31: 623-46

- Yao X-L, Ye C-H, Liu Q, Wan J-b, Zhen J, et al. 2013. Motoneuron differentiation of induced pluripotent stem cells from SOD1G93A mice. *PLoS ONE* 8: e64720
- Ying Q-L, Nichols J, Chambers I, Smith A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115: 281-92
- Yoshimura Y, Lin Y, Yagi H, Lee Y-H, Kitayama H, et al. 2012. Distinguishing crystal-like amyloid fibrils and glass-like amorphous aggregates from their kinetics of formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 14446-51
- Young W. 2009. Review of Lithium Effects on Brain and Blood. *Cell Transplantation* 18: 951-75
- Yu L, Guan Y, Wu X, Chen Y, Liu Z, et al. 2013. Wnt Signaling is Altered by Spinal Cord Neuronal Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis Transgenic Mice. *Neurochemical Research* 38: 1904-13
- Yumoto N, Kim N, Burden SJ. 2012. Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature* 489: 438
- Zhang B, Luo S, Dong XP, Zhang X, Liu C, et al. 2007. Beta-catenin regulates acetylcholine receptor clustering in muscle cells through interaction with rapsyn. *J Neurosci* 27: 3968-73
- Zhang B, Luo S, Wang Q, Suzuki T, Xiong WC, Mei L. 2008. LRP4 serves as a co-receptor of agrin. *Neuron* 60: 285-97
- Zhang J, Ito H, Wate R, Ohnishi S, Nakano S, Kusaka H. 2006. Altered distributions of nucleocytoplasmic transport-related proteins in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica* 112: 673-80
- Zhang K, Shi P, An T, Wang Q, Wang J, et al. 2013. Food restriction-induced autophagy modulates degradation of mutant SOD1 in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Brain Research* 1519: 112-19
- Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, et al. 1998. Destabilization of β -catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 395: 698
- Zhou T, Zu G, Zhang X, Wang X, Li S, et al. 2016. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 through the Wnt/ β -catenin signaling pathway in both in vivo and in vitro models of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 101: 480-89
- Zhu D. 2006. Lipid Rafts Serve as a Signaling Platform for Nicotinic Acetylcholine Receptor Clustering. *Journal of Neuroscience* 26: 4841-51

Zou Y. 2004. Wnt signaling in axon guidance. *Trends in Neurosciences* 27: 528-32

