

# EL PROCÉS DEGENERATIU DE LES MOTONEURONES ESPINALS EN L'ESCLEROSI LATERAL AMIOTRÒFICA (ELA) ESTUDIAT EN UN MODEL EXPERIMENTAL D'EXCITOTOXICITAT PER GLUTAMAT

Josep E. Esquerda, Jordi Calderó, Anna Casanovas, Dolors Ciutat, Celia Casas,  
Joan Ribera i Olga Tarabal

*Unitat de Neurobiologia Cel·lular. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques  
Facultat de Medicina. Universitat de Lleida*

## SUMMARY

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disorder resulting from the selective dysfunction and loss of motoneurons (MN) in the motor cortex, brain stem and spinal cord. The loss of MN leads to a progressive atrophy of skeletal muscles, paralysis and, finally, death to respiratory failure. Approximately 10 % of ALS is familial, typically with an autosomal dominant pattern of inheritance. The majority of ALS cases (90 %) are sporadic with no known genetic component that accounts for the disease. Despite increasing research interest in this disease its cause and mechanisms responsible for the selective loss of MN remain obscure. Glutamate is the major excitatory neurotransmitter that mediates afferent inputs to MN. There is increasing evidence that excitotoxicity mediated by glutamate is involved in neurodegeneration that occurs in sporadic ALS. For spinal MN, the rapid clearing of glutamate from the synaptic and extracellular environment is accomplished by glutamate transporters present in neurons and surrounding glial cells. Inefficient glutamate transport due to a selective loss of glial transporters can lead to a chronic elevation of extracellular glutamate. Glutamate in excess leads to a persistent activation of glutamate receptors and loss of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis with activation of calcium-dependent enzymes that results in oxidative stress and neuronal death. This review discusses new results obtained from a paradigm of excitotoxicity developed in our laboratory by using the chick embryo. Our studies demonstrate that chronic glutamate receptor overactivation results in severe and specific changes in MN such as protein aggregation and organelle pathology suggestive of disturbance in intracellular membrane trafficking. All these

changes may represent an experimental model to reproduce some neuropathological alterations seen in degenerating human ALS MN including inclusion or Bunina bodies. This model may be useful to gain new insights into the relationship between excitotoxicity by glutamate and chronic degeneration of MN in sporadic ALS.

## INTRODUCCIÓ

L'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) és una malaltia humana devastadora en la qual es manifesta una paràlisi progressiva i generalitzada de la musculatura esquelètica que condueix, finalment, a la depressió respiratòria i a la mort en una mitjana de cinc anys des de l'inici dels símptomes. Aquesta paràlisi es deu a un procés degeneratiu que afecta selectivament les neurones motores (motoneurons, MN) de la banya anterior de la medulla espinal i de l'escorça cerebral. La malaltia fou descrita per primera vegada per Charcot l'any 1869 i té una prevalença d'entre 1 i 5 per 100.000 habitants. Aproximadament un 10 % dels casos tenen un caràcter familiar, mentre que en la resta (un 90 %), no s'hi troba cap component genètic i, per tant, són casos esporàdics.

Per a situar anatòmicament aquesta afecció, en la figura 1a es presenta un esquema de la via motora voluntària realitzat per Cajal completament vigent actualment però distint del realitzat pels seus contemporanis; les neurones representades en el dibuix són aquelles que queden afectades en l'ELA. En la figura 1b es mostra una fotografia realitzada recentment per nosaltres a partir d'una preparació de cervell de rata original de Ramón y Cajal impregnada segons el mètode de Golgi, en la qual es pot observar una neurona motora piramidal de l'escorça encara perfectament conservada després d'uns cent anys.

Malgrat la considerable activitat de recerca que es realitza sobre aquesta malaltia i els notables descobriments que aquesta recerca ha aportat en els últims anys, tant l'etiologia com la patogènia de l'ELA romanen desconegudes i, per desgràcia, no existeix, encara avui dia, cap tractament eficaç per a aturar el procés. És per això que el diagnòstic de la malaltia provoca una tremenda frustració a pacients i metges. No obstant això, en les últimes dècades s'han aportat dades molt rellevants que fan albirar un horitzó ja no tan llunyà d'esperança en la troballa d'un tractament vàlid per a aquesta dramàtica malaltia (vegeu, per exemple, Julien, 2001).

Pel que fa a la forma esporàdica de l'ELA, entre les troballes més destacables figura la demostració, cada vegada més fefaent, que en la degeneració i mort selectiva de les MN participen fenòmens excitotòxics desencadenats, molt probablement, per un excés de glutamat, el qual s'ha detectat en el líquid cefaloraquídi d'aquests pacients. Aquesta idea pren com a punt de partida els estudis pioners del grup de J. Rothstein en el Departament de Neurologia de la Universitat Johns Hopkins

(Rothstein *et al.*, 1990). Aquest mateix grup va detectar també una deficiència en el transport de glutamat en preparacions de sinaptosomes de cervell i medul·la espinal procedents de pacients que havien mort d'ELA (Rothstein *et al.*, 1992). Aquestes alteracions estaven restringides a les àrees de teixit afectades per la malaltia i podrien ser degudes a una pèrdua d'activitat de les proteïnes transportadores de glutamat, com el transportador glial EAAT2 (Ferrarese *et al.*, 2001), que podria ser degut a un empalmament (*splicing*) aberrant de l'mRNA de l'EAAT2 (Lin *et al.*, 1998). L'increment dels nivells de glutamat extracel·lular per la fallida dels sistemes de transport cap a l'interior de la cèl·lula sembla que és el responsable de la sobreestimulació dels receptors de glutamat presents en les MN i d'induir la seva mort per un mecanisme per mitjà de calci. La vulnerabilitat selectiva de les MN als estímuls excitotòxics podria dependre de diversos factors com per exemple, la particular estructura d'aquestes neurones amb la seva grandària somàtica i un axó extremadament llarg que, tot plegat, podria fer-les més críticament dependents del metabolisme oxidatiu i, per tant, més vulnerables a l'estrès. Altres factors que s'han relacionat amb aquesta vulnerabilitat selectiva són la manca en les MN de proteïnes fixadores de calci com la calbindina-28K o la parvalbúmina (Alexianu *et al.*, 1994; Van den Bosch *et al.*, 2002), o l'absència de la subunitat GluR2 en els seus receptors AMPA/kainat, ja que aquesta subunitat condiciona la permeabilitat al calci d'aquests receptors (Van Damme *et al.*, 2002). Una altra característica molecular descrita recentment i que també podria explicar la pèrdua selectiva de MN somàtiques en l'ELA és l'existència d'una nova subunitat del receptor NMDA anomenada NR3B, que es troba específicament expressada en aquestes MN (Nishi *et al.*, 2001).

En relació amb les formes familiars d'ELA, un fet molt important ha estat la identificació, en un 20 % dels casos, de mutacions en el gen que codifica per a la Cu/Zn superòxid dismutasa (SOD1). Es desconeix, però, la raó per la qual aquestes mutacions afecten la viabilitat de les MN. Com que aquest enzim forma part dels sistemes antioxidants, hom suggereix que la seva deficiència determinaria la degeneració de MN per estrès oxidatiu. Aquesta idea no es contraposa amb la hipòtesi excitotòxica, ja que l'estrès oxidatiu induït per una sobrecàrrega de calci intracel·lular és un element essencial en el desencadenament de la mort neuronal excitotòxica. D'altra banda, les MN deficientes en SOD1 podrien ser més vulnerables a l'acció del glutamat pel fet de tenir disminuïda la seva defensa antioxidant. També s'ha demostrat que ratolins portadors de mutacions de la SOD1 són més sensibles a la mort induïda pel sistema Fas-Fas lligand i per la sintasa de l'òxid nítric (Raoul *et al.*, 2002). El que és més difícil d'interpretar és l'existència de ratolins transgènics, portadors de mutacions de SOD1 que no comporten disminució de la seva activitat catalítica i que, malgrat això, desenvolupen igualment processos de degeneració de les seves MN. De tota manera, es creu que aquestes mutacions determinen l'adquisició

d'una nova propietat de la molècula que fa que esdevingui tòxica. També s'han aportat resultats experimentals que indiquen que algunes formes mutants de la SOD1 formen agregats que atrapen proteïnes de xoc tèrmic (*heat shock*) que en estar reclutades no podrien exercir el seu efecte natural antiapoptòtic (Okado-Matsumoto i Fridovich, 2002). D'altra banda, els ratolins mutants presenten un increment de l'activitat de la cinasa dependent de ciclina-5 (CDK5), la qual cosa produeix una hiperfosforilació de la proteïna tau i d'altres substrats amb efectes altament lesius per a les neurones (Nguyen *et al.*, 2001). Una altra dada important és que estudis en ratolins transgènics han demostrat que per a produir la malaltia, la mutació no s'ha d'expressar en neurones sinó que, sorprenentment, ha d'implicar cèl·lules no neuronals, com és el cas de la glia (Lino *et al.*, 2002). Això ha suggerit en aquests autors un model en el qual es postula que l'acumulació de SOD mutada en les cèl·lules no neuronals donaria lloc a un desequilibri crònic i local en el sistema que manté l'homeostasi del glutamat en l'espai extracel·lular, ja que aquestes cèl·lules hi participen de manera principal gràcies a l'activitat dels seus transportadors de glutamat. Així doncs, les MN patirien també en aquest cas una agressió excitotòxica per mitjà de glutamat, de manera que els mecanismes patogènics de l'ELA familiar convergirien amb els de l'ELA esporàdica.

Més recentment s'han descrit noves mutacions que afecten una proteïna de nova identificació que per la seva relació amb l'ELA s'ha anomenat *alsin* (Hadano *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001). Essent aquesta una proteïna amb funcions desconegudes, tampoc no es coneix, de moment, la relació entre la seva mutació i el mecanisme patogènic que condueix a la degeneració de MN.

A partir de les dades esmentades, la hipòtesi excitotòxica es mostra especialment atractiva com a punt de partida per a l'esclariment més definitiu de l'etiologia i patogènia de l'ELA. A més, és una hipòtesi operativa, ja que marca de manera molt clara la direcció de les investigacions que s'han de dur a terme per a seguir avançant en el coneixement d'aquesta malaltia i ofereix, també, bases racionals per al disseny de noves estratègies terapèutiques.

En el nostre laboratori hem investigat les particularitats cel·lulars i moleculars dels processos excitotòxics per mitjà de receptors de glutamat en la població de MN espinals, per tal d'establir la seva possible vinculació amb els mecanismes patogènics de l'ELA. L'embrió de pollastre ofereix un sistema amb avantatges experimentals únics per a l'estudi de la biologia de les MN i, en particular, dels fenòmens de mort neuronal (vegeu, per exemple, Oppenheim, 1991 i Calderó *et al.*, 1998). És per això que gran part del nostre treball d'investigació, del qual exposarem aquí alguns dels seus resultats, s'ha desenvolupat en aquest sistema experimental. Hem pogut establir un model de neurotoxicitat per l'àcid N-metil-D-aspartic (NMDA) que produeix en l'embrió de pollastre una malaltia de la motoneurona que presenta tot un conjunt de dades neuropatològiques que la fan similar a l'ELA humana. Per tal d'in-

terpretar millor aquestes troballes és necessari conèixer abans algunes dades essencials pel que fa al desenvolupament les MN en l'embrió de pollastre.

## MORT CEL·LULAR PROGRAMADA DE MN DURANT EL DESENVOLUPAMENT

Les MN espinals es desenvolupen molt ràpidament en el tub neural primerenc. En l'embrió de pollastre de cinc dies d'incubació (dia embrionari —a partir d'ara, E— 5), aquestes neurones ja han estat generades, han migrat cap a la banya ventral i presenten un grau notable de diferenciació morfològica, havent adquirit ja unes prolongacions axonals i dendrítiques prou complexes, tal com ja ho va descriure Cajal (figura 2a).

En un embrió de pollastre E6, el nombre de MN diferenciades localitzades en la banya anterior de la regió lumbosacra de la medulla espinal és d'unes disset mil (figures 2b i 2c). Al voltant del 95 % d'aquestes neurones han estat generades durant les primeres quaranta-vuit hores d'incubació. Entre l'E6 i l'E12, el nombre de MN es redueix a unes deu mil tres-centes i la població queda així estabilitzada (figura 3). Aquesta important reducció es du a terme per un fenomen de mort neuronal fisiològica que succeeix de manera estereotipada principalment entre l'E6 i l'E10, i que coincideix amb la sinaptogènesi neuromuscular (Hamburger, 1977; Oppenheim, 1991). Aquest procés de mort cel·lular programada natural adopta un fenotip similar al descrit com a apoptosi (figures 2d-2j), encara que amb algunes matisacions (Clarke, 2002), i està regulat per diversos factors entre els quals destaquen: els teixits diana d'innervació (múscul), l'activitat funcional tant de les sinapsis neuromusculars en desenvolupament com de les projeccions aferents a les MN, i la influència de factors derivats de cèl·lules glials, de la matriu extracel·lular i de factors humerals diversos (Esquerda *et al.*, 1989; Ciutat *et al.*, 1995; Calderó *et al.*, 1998; Oppenheim *et al.*, 2001, 2003).

De la importància del teixit muscular a innervar, en parlen eloqüentment els experiments d'ablació precoç (a l'E2) de l'esbós de la pota, de manera que les MN no puguin trobar cap teixit diana (múscul) adient per a establir contacte. En aquesta situació les MN maduren normalment fins a l'E6, però després, coincidint amb el principal període de mort natural fisiològica (de l'E6 a l'E10), moren massivament per apoptosi (figura 2k) i deixen la columna motora lateral quasi completament deplecionada de MN (Hamburger, 1958; Oppenheim *et al.*, 1978; Calderó *et al.*, 1998). Experiments *in vivo* i *in vitro* han posat de manifest que aquesta mort massiva induïda per la manca de diana es pot evitar administrant factors neurotròfics que presumptament podrien substituir aquells subministrats de manera natural pels teixits (Comella *et al.*, 1994; Calderó *et al.*, 1998).

Aquest sistema experimental ens ha aportat coneixements nous sobre els mecanismes implicats en el control de la supervivència de les MN espinals i en la inducció d'apoptosi a aquestes neurones. Un aspecte cabdal de tot això és, però, determinar la rellevància d'aquestes dades en el context de la malaltia de la motoneurona. És obvi que conèixer com les MN es moren fisiològicament ens pot ajudar també a conèixer la seva mort patològica. Diversos factors neurotròfics que promouen la supervivència de MN en l'embrió de pollastre han estat provats com a possibles agents terapèutics tant en ratolins portadors de mutacions de la SOD com, fins i tot, en assaigs clínics en malalts d'ELA. Malauradament, encara que s'hagin obtingut alguns resultats beneficiosos en els ratolins, el tractament en humans encara no ha donat resultats satisfactoris (Rothstein, 1996; Jackson *et al.*, 2002).

#### DEGENERACIÓ DE MN A L'ELA I APOPTOSI

Un altre aspecte que cal definir amb més detall és la forma que adopta la mort neuronal en l'ELA, ja que les dades que es tenen fins ara són controvertides (Guégan i Przedborski, 2003). Mentre que hi ha estudis que semblen indicar l'existència d'un procés d'apoptosi asincrònic en les MN humanes afectades d'ELA (Martin, 1999), en altres això no es confirma. Pel que fa als ratolins transgènics de SOD que desenvolupen la malaltia de la motoneurona, en la major part d'estudis no s'han trobat signes d'apoptosi (per exemple, Migheli *et al.*, 1999), i són més aviat patents les morfologies de caire citoplasmàtic o vacuolar en les neurones en procés de mort (Clarke, 1990, 2002). No obstant això, en ratolins transgènics en fases terminals de la malaltia s'han trobat, ocasionalment, signes d'apoptosi tant en neurones com en cèl·lules glials (Guégan i Przedborski, 2003). Cal dir, però, que la mort neuronal pot desencadenar secundàriament mort per apoptosi en altres cèl·lules, com passa per exemple en les cèl·lules de Schwann immadures (Ciutat *et al.*, 1996; Winseck *et al.*, 2002). De tota manera, la degeneració de les MN no s'evita per la sobreexpressió de la proteïna antiapoptòtica bcl-2 (Kostic *et al.*, 1997). És molt probable que la dificultat de trobar apoptosi en l'ELA respongui a la seva previsible escassetat en les mostres a examinar ja que la velocitat de pèrdua neuronal en aquesta malaltia és lenta i, contràriament, la vida mitjana del fenotip apoptòtic, molt curta. D'altra banda, l'apoptosi podria representar només l'etapa final d'un procés degeneratiu de llarga duració que donaria lloc a una disfunció neuronal crònica no necessàriament associada a mort neuronal, almenys durant un llarg període de temps.

## RESPOSTA EXCITOTÒXICA AGUDA DE LES MN PER MITJÀ DE L'ACTIVACIÓ DE RECEPTORS DE GLUTAMAT

Atesa la importància de la neurotoxicitat per mitjà dels receptors de glutamat en la patogènia de l'ELA, hem iniciat estudis per tal d'analitzar amb cert detall els processos excitotòxics en les MN espinals d'embrió de pollastre. Hem vist que aquestes neurones són especialment vulnerables a l'acció de diverses excitotoxines glutamatèrgiques. Les excitotoxines glutamatèrgiques són substàncies naturals o de síntesi que tenen una potent activitat agonista per als distints subtipus de receptors de glutamat i que són capaces de desencadenar neurotoxicitat a causa de l'activació incontrolada d'aquests receptors. Entre les més conegudes tenim l'NMDA, l' $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionat (AMPA), l'àcid quisquàlic, l'àcid kaínic i l'àcid domoic. Tots aquests productes, administrats *in ovo*, produeixen una agressió excitotòxica aguda a les MN que comporta la seva degeneració i mort de manera molt ràpida, en qüestió d'hores (Calderó *et al.*, 1997). Durant aquest procés excitotòxic agut les MN presenten alteracions molt importants en l'estructura i organització dels orgànuls citoplasmàtics caracteritzades per la vacuolització massiva dels sistemes membranaris intracel·lulars que condueix a una gran desorganització que esborra el confinament estructural de les seves parts (figures 4c-4f). Aquesta vacuolització afecta precoçment l'aparell de Golgi i les estructures tubulovesiculars adjacents i s'estén després al reticle endoplasmàtic i, fins i tot, a l'embolcall nuclear; aquest últim es mostra molt inflat, i forma un rosari de butllofes sorgides per l'eixamplament de l'espai intermembranari i solament interromput periòdicament en els porus nuclears. L'embolcall nuclear també presenta discontinuïtats que permeten l'ejecció cap al citoplasma de material nuclear. Tanmateix, hi ha alteracions mitocondrials severes, amb densificació de la matriu i/o desorganització de les crestes. Pel que fa al nucli, hi ha condensació de la cromatina en forma de grumolls dispersos, morfològicament distinta de les grans masses compactes observades en les MN durant la mort natural programada. Els nuclis, no obstant això, mostren positivitats a la reacció del TUNEL sense que les cèl·lules presentin activació de caspases (Ayala *et al.*, 1999; Ribera *et al.*, 2002) (figures 4c-4f). En ocasions, la positivitat al TUNEL s'estén també cap al citoplasma, i indica la sortida de material nuclear degradat a través de les discontinuïtats de l'embolcall nuclear (figures 4b i 4g). Per tant, no podem definir aquesta forma de mort neuronal com a apoptòtica ja que, malgrat la seva positivitat al TUNEL, a diferència de l'apoptosi, els canvis citoplasmàtics són molt precoços i prominents sense anar acompanyats d'activació de caspases (Ayala *et al.*, 1999; Ribera *et al.*, 2002). Per això, aquest tipus de mort la definim com a necrosi excitotòxica aguda. També es podria incloure dins la recentment tipificada apoptosi caspasa independent, que és inhibible per la ciclosporina-A (Chang *et al.*, 2002). Nosaltres tenim dades preliminars que la necrosi excitotòxica

aguda en les MN es pot inhibir també amb ciclosporina-A. També tenim dades recents que demostren l'activació de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) així com de la depleció d'ATP i NAD<sup>+</sup>. També, d'acord amb un procés de mort independent de caspases, tenim dades preliminars que demostren la translocació del factor inductor de l'apoptosi (AIF) cap al nucli de les MN (figures 4*b* i 4*i*).

La vulnerabilitat de les MN de l'embrió de pollastre a les excitotoxines s'adquireix durant el desenvolupament de manera abrupta després de l'E7; abans d'aquesta edat, les MN espinals són refractàries a l'excitotoxicitat per glutamat. Probablement això reflecteix l'adquisició de receptors de glutamat funcionals durant la maduració de les MN. Totes les excitotoxines analitzades (NMDA, AMPA, àcid kaínic i àcid quisquàlic) mostren una capacitat similar per a desencadenar lesions en la medul·la espinal de l'embrió de pollastre, sempre que siguin administrades després de l'E7. No obstant això, quan s'analitza l'efecte en corbes de dosi-resposta, hom veu que, pel que fa a l'NMDA, el perfil d'inducció de mort a les MN és molt abrupte. En canvi, l'àcid kaínic a dosis molt baixes indueix lesió a les MN, però no de manera suficient com per a provocar la seva mort. Quan s'observen les alteracions cel·lulars produïdes per dosis subletals d'àcid kaínic, es pot observar també una vacuolització extensa del citoplasma que ultraestructuralment implica l'aparell de Golgi i un ampli conjunt d'estructures membranàries, tubs i vesícules, adjacents. A diferència de la lesió irreversible, però, la vacuolització no afecta el reticle endoplasmàtic granular en les regions més perifèriques del soma neuronal ni tampoc l'èmbolcall nuclear. En congruència amb la manca de letalitat de la lesió, aquesta vacuolització restringida no va acompanyada de fragmentació de la cromatina encara que aquesta pot mostrar cert grau de condensació. En aquest cas, els canvis vacuolars són reversibles i els sistemes d'endomembranes es reconstrueixen adquirint una estructura gairebé normal al cap d'un o dos dies posteriors a l'estímul excitotòxic subletal. Cal analitzar, però, si les MN recuperades d'un estímul excitotòxic subletal presenten canvis més subtils que determinin la seva disfunció a llarg termini.

#### DEGENERACIÓ CRÒNICA DE MN SECUNDÀRIA A UNA AGRESSIÓ EXCITOTÒXICA SUBLETAL I LA SEVA RELACIÓ AMB LA NEUROPATOLOGIA DE L'ELA

És obvi que la necrosi per excitotoxicitat aguda que es presenta poques hores després de l'agressió sobre les MN no representa el procés patològic que es desenvolupa en l'ELA, ja que aquesta és una malaltia crònica que comporta un procés de degeneració i pèrdua neuronal relativament lent. Aquest model d'excitotoxicitat aguda seria més aviat homòleg del mecanisme patogènic desenvolupat en les lesions



de la medul·la espinal en processos isquèemics o traumàtics (Wrathall *et al.*, 1994; Agrawal i Fehlings, 1996).

La mateixa neuropatologia de l'ELA indica un procés degeneratiu de llarga evolució, amb canvis pseudocromatolítics en les MN, incusions citoplasmàtiques diverses, axonopatia proximal i distal amb presència d'esferoides axonals probablement indicatius d'una alteració en el transport axoplasmàtic o axostasis (Chou, 1995). Pel que fa a les incusions citoplasmàtiques, se'n troben de distints tipus: eosinòfiles o cossos de Bunina, basòfiles, hialines o bé conglomerades. Entre aquestes, els cossos de Bunina s'han considerat com a patognomònics de la neurodegeneració associada a l'ELA. Aquests cossos estan constituïts per material amorf electrodens juntament amb estructures tubulars i vesiculars, i s'ha suggerit que podrien representar cúmuls anormals d'un material proteic desconegut associat a l'aparell de Golgi (Okamoto, 1996). Els cossos de Bunina addicionalment presenten una immunoreactivitat positiva per la cistatina-C, la qual cosa reforça la seva relació amb l'aparell de Golgi (Okamoto *et al.*, 1993).

Fins ara no hi havia cap model experimental que hagués reproduït aquest tipus de patologia. Nosaltres, utilitzant excitotoxines aplicades crònicament a l'embrió de pollastre, hem pogut induir una degeneració de les MN que presenta característiques citopatològiques que creiem homòlogues de les de l'ELA humana (Tarabal *et al.*, 2001). A més, en aquest model s'observen alteracions estructurals que afecten el sistema cel·lular d'endomembranes que podrien reflectir els estadis més primerencs de formació dels cossos de Bunina. Si això és així es demostraria la relació directa entre un mecanisme excitotòxic i la formació d'aquest cossos.

Per tal d'obtenir aquest efecte cal realitzar una aplicació crònica d'excitotoxina, com l'NMDA, a embrions de pollastre més joves que els utilitzats per a induir necrosi excitotòxica aguda; és a dir, iniciant el tractament en etapes del desenvolupament embrionari prèvies a l'adquisició de la vulnerabilitat de les MN per l'excitotoxicitat (abans de l'E7). Així, l'administració diària de NMDA entre l'E5 i l'E9 de dosis que aplicades aïlladament després de l'E7 serien suficients per a desencadenar una necrosi excitotòxica massiva en la medul·la espinal, no provoca pèrdua neuronal. I no tan sols això, sinó que, a més, aquest tractament crònic (de l'E5 a l'E9) amb NMDA inhibeix el procés natural de mort neuronal programada per apoptosi que en les MN espinals d'embrió de pollastre succeeix, com hem esmentat abans, entre l'E6 i l'E10. Per tant, l'administració crònica i precoç de NMDA provoca una tolerància per part de les MN a una ulterior agressió excitotòxica i també una incompetència per a desenvolupar apoptosi. Això fa que, paradoxalment, un embrió de pollastre E10 que ha rebut un tractament diari de NMDA entre l'E5 i l'E9 contingui un nombre superior de MN respecte a un embrió control, efecte derivat de la supressió del procés natural d'eliminació apoptòtica de les MN (figura 5). Fins i tot, la mort apoptòtica de les MN secundària a l'ablació de la diana mus-

cular queda inhibida per aquest tractament crònic amb NMDA. La tolerància a la mort neuronal excitotòxica es correlaciona amb una regulació a la baixa de la subunitat NR1 del receptor NMDA. A més, el tractament crònic amb NMDA induïx tolerància a la mort neuronal excitotòxica per mitjà tant de receptors NMDA com no NMDA, i això es correlaciona, també, amb una disminució de l'activitat funcional dels receptors de glutamat AMPA/kainat permeables al calci. Aquestes troballes estan descrites amb més detall en un article previ (Lladó *et al.*, 1999).

Com s'ha dit anteriorment, malgrat que les MN esdevinguin transitòriament tolerants a la mort excitotòxica aguda i incompetents per a desenvolupar apoptosi, experimenten canvis patològics cel·lulars importants. Aquests canvis estan descrits també detalladament en una publicació prèvia del nostre grup (Tarabal *et al.*, 2001) i consisteixen en l'aparició d'un sistema complex de túbuls i vesícules que contenen material electrodens i que sembla que ocupen la regió del *trans-Golgi network*, la qual estaria exageradament eixamplada (figures 6*g* i 6*h*). L'aparell de Golgi queda redistribuït al voltant d'aquesta estructura (figures 6*a* i 6*b*). També es produeix una concentració de partícules amb immunoreactivitat positiva per la cistatina-C a l'interior de la regió, la qual cosa suggereix una possible relació amb els coscos de Bunina (figures 6*c* i 6*d*). Aquestes formacions evolucionen en el decurs de dies cap a estructures encara més denses acompanyades de fagolisomes amb figures d'autofàgia. Es tracta, doncs, d'un procés de degeneració crònica de MN no acompanyat, almenys inicialment, de mort cel·lular, que simula alguns dels trets característics de la malaltia de la motoneurona humana. Cal tenir en compte que les alteracions en l'aparell de Golgi, i especialment la seva fragmentació, han estat també descrites com a elements primordials en etapes inicials de la degeneració de MN tant en l'ELA humana com en ratolins portadors de mutacions de la SOD (Gonatas *et al.*, 1992; Mourelatos *et al.*, 1994, 1996). Tot això indica la importància de l'alteració dels processos de tràfic de membrana i de proteïnes en la patogènia d'aquesta neurodegeneració. També hem pogut detectar en les MN sotmeses al nostre paradigma l'existència d'axonopatia amb acumulació d'esferoides i d'un increment en el soma d'algunes MN del contingut de neurofilaments fosforilats, característiques també pròpies de la malaltia de la motoneurona humana. Tanmateix, hi ha dades que indiquen una activació exagerada d'algunes cinases i particularment de CDK5 durant la degeneració de MN (Patzke i Tsai, 2002). En aquest sentit, és interessant la idea proposada que la fosforilació d'algunes proteïnes com els neurofilaments pot tenir un efecte amortidor sobre la fosforilació d'altres substrats potencialment més importants de cara a la viabilitat neuronal i per tant, pot ser beneficiosa per a la cèl·lula (figura 6*f*).

Pel que fa a la naturalesa del material proteic electrodens acumulat en les MN, en observacions preliminars hem vist que aquest material presenta una forta immunoreactivitat enfront d'un anticòs dirigit contra la proteïna HERC1 (figures 6*e* i

6i). Aquesta és una proteïna de pes molecular molt alt amb activitat estimuladora de l'intercanvi de nucleòtids de guanina (GEF), que s'ha localitzat tant en l'aparell de Golgi com en el citosol, sense que se li hagi assignat, de moment, cap funció de manera clara (Rosa *et al.*, 1996, 1997). Pel que fa a la troballa de la possible acumulació d'aquesta proteïna en les MN degenerades segons el nostre model, s'ha de destacar la recent identificació de mutacions de l'alsin en formes familiars d'ELA (Hadano *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001, i comentat per Shaw, 2001) abans esmentada. De la seqüència d'aminoàcids de l'alsin es dedueix que es tracta d'una proteïna amb dominis d'activitat GEF, homòloga de l'HERC1. Si la disfunció d'aquesta proteïna associada a la seva mutació és suficient com per a determinar una malaltia de la motoneurona, és factible formular la hipòtesi que en un paradigma d'excitotoxicitat com el nostre es puguin produir canvis posttraduccionalment que afectin proteïnes GEF com l'HERC1, que determinarien la seva agregació i conseqüent disfunció. D'aquesta manera podrien convergir, en l'àmbit cel·lular, mecanismes patogenètics de formes esporàdiques i hereditàries d'ELA. D'altra banda, l'agregació de proteïna és un element important a indagar que podria explicar la manera de progressar de la malaltia d'acord amb els segments miotòmics (Lindberg *et al.*, 2002).

Finalment, també volem ressaltar que tant en humans com en ratolins portadors de mutacions de la SOD s'observa un creixement axonal reactiu o *sprouting* en els nervis intramusculars i les sinapsis neuromusculars (Coërs, 1982; Millecamps *et al.*, 2001). Aquesta resposta és prou coneguda en l'àmbit de l'electrofisiologia clínica, que detecta la denervació-reinnervació muscular i altres alteracions en la descàrrega neuronal, fins i tot abans de l'atròfia muscular (Schwartz i Swash, 1995). Nosaltres també hem vist alteracions en el patró d'innervació intramuscular i en l'organització de la sinapsi neuromuscular en desenvolupament després del tractament crònic amb NMDA.

En conjunt, creiem que el model descrit ofereix possibilitats úniques per a l'estudi cel·lular i molecular dels mecanismes específics de neurodegeneració en les MN somàtiques induïts per excitotoxicitat per mitjà de receptors de glutamat i, per tant, representa una aproximació addicional per a la investigació de la patogènia de l'ELA, així com per al disseny i assaig de noves estratègies terapèutiques per a aquesta malaltia tan devastadora.

## BIBLIOGRAFIA

- AGRAWAL, S. K.; FEHLINGS, M. G. (1996). «Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger, and the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger». *J. Neurosci.*, núm. 16, p. 545-552.
- ALEXIANU, M. E.; HO, B. K.; MOHAMED, A. H.; LA BELLA, V.; SMITH, R. G.; APPEL, S. H.

- (1994). «The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis». *Ann. Neurol.*, núm. 36, p. 846-858.
- AYALA, V.; CASAS, C.; RIBERA, J.; CALDERÓ, J.; OPPENHEIM, R. W.; ESQUERDA, J. E. (1999). «Specific association of c-Jun-like immunoreactivity but not c-Jun p39 with normal and induced programmed cell death in the chick embryo». *J. Neurobiol.*, núm. 38, p. 171-190.
- BOSCH, L. van den; SCHWALLER, B.; VLEMINCKX, V.; MEIJERS, B.; STORK, S.; RUEHLICKE, T.; HOUTTE, E. van; KLAASSEN, H.; CELIO, M. R.; MISSIAEN, L.; ROBBERECHT, W.; BERCHTOLD, M. W. (2002). «Protective effect of parvalbumin on excitotoxic motor neuron death». *Exp. Neurol.*, núm. 174, p. 150-161.
- CALDERÓ, J.; CIUTAT, D.; LLADÓ, J.; CASTÁN, E.; OPPENHEIM, R. W.; ESQUERDA, J. E. (1997). «Effects of excitatory amino acids on neuromuscular development in the chick embryo». *J. Comp. Neurol.*, núm. 387, p. 73-95.
- CALDERÓ, J.; PREVETTE, D.; MEI, X.; OAKLEY, R. A.; LI, L.; MILLIGAN, C.; HOUEYOU, L.; BUREK, M.; OPPENHEIM, R. W. (1998). «Peripheral target regulation of the development and survival of spinal sensory and motor neurons in the chick embryo». *J. Neurosci.*, núm. 18, p. 356-370.
- CHANG, L. K.; JOHNSON, E. M. (2002). «Cyclosporin inhibits caspase-independent death of NGF-deprived sympathetic neurons: a potential role for mitochondrial permeability transition». *J. Cell Biol.*, núm. 157, p. 771-781.
- CHOU, S. M. (1995). «Pathology of motor system disorder». A: LEIGH, P. N.; SWASH, M. [ed.]. *Motor neuron disease*. Berlín: Springer-Verlag, p. 52-118.
- CIUTAT, D.; CALDERÓ, J.; OPPENHEIM, R. W.; ESQUERDA, J. E. (1996). «Schwann cell apoptosis during normal development and after axonal degeneration induced by neurotoxins in the chick embryo». *J. Neurosci.*, núm. 16, p. 3979-3990.
- CIUTAT, D.; ESQUERDA, J. E.; CALDERÓ, J. (1995). «Evidence for calcium regulation of spinal cord motoneuron death in the chick embryo in vivo». *Develop. Brain Res.*, núm. 86, p. 167-179.
- CLARKE, P. G. (1990). «Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms». *Anat. Embryol.*, núm. 181, p. 195-213.
- (2002). «Apoptosis: from morphological types of cell death to interacting pathways». *Trends Pharmacol. Sci.*, núm. 23, p. 308-309.
- COËRS, C. (1982). «Pathology of intramuscular nerves and nerve terminals». A: MASTAGLIA, F. L.; WALTON, J. [ed.]. *Skeletal muscle pathology*. Churchill Livingstone, p. 483-507.
- COMELLA, J. X.; SANZ-RODRIGUEZ, C.; ALDEA, M.; ESQUERDA, J. E. (1994). «Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering active cell death program in vitro». *J. Neurosci.*, núm. 14, p. 2674-2686.
- DAMME, P. van; BOSCH, L. van den; HOUTTE, E. van; CALLEWAERT, G.; ROBBERECHT, W. (2002). «GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective vulnerability of motor neurons to excitotoxicity». *J. Neurophysiol.*, núm. 88, p. 1279-1287.
- ESQUERDA, J. E.; CIUTAT, D.; COMELLA, J. X. (1989). «Absence of histochemical immunoreactivity to calcitonin-gene related peptide (CGRP) in spinal cord motoneurons from (+)-tubocurarine-treated chick embryos». *Neurosci. Lett.*, núm. 105, p. 1-6.

- FERRARESE, C.; SALA, G.; RIVA, R.; BEGNI, B.; ZOIA, C.; TREMOLIZZO, L.; GALIMBERTI, G.; MILLUL, A.; BASTONE, A.; MENNINI, T.; BALZARINI, C.; FRATTOLA, L.; BEGHI, E. (2002). «Decreased platelet glutamate uptake in patients with amyotrophic lateral sclerosis». *Neurology*, núm. 56, p. 270-272.
- GONATAS, N. K.; STIEBER, A.; MOURELATOS, Z.; CHEN, Y.; GONATAS, J. O.; APPEL, S. H.; HAYS, A. P.; HICKEY, W. F.; HAUW, J. J. (1992). «Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis». *Am. J. Pathol.*, núm. 140, p. 731-737.
- GUÉGAN, C.; PRZEDBORSKI, S. (2003). «Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis». *J. Clin. Invest.*, núm. 111, p. 153-161.
- HADANO, S.; HAND, C. K.; OSUGA, H.; YANAGISAWA, Y.; OTOMO, A.; DEVON, R. S.; MIYAMOTO, N.; SHOWGUCHI-MIYATA, J.; OKADA, Y.; SINGARAJA, R.; FIGLEWICZ, D. A.; KWIATKOWSKI, T.; HOSLER, B. A.; SAGIE, T.; SKAUG, J.; NASIR, J.; BROWN, R. H., JR.; SCHERER, S. W.; ROULEAU, G. A.; HAYDEN, M. R.; IKEDA, J. E. (2001). «A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis». *Nat. Genet.*, núm. 29, p. 166-173.
- HAMBURGER, V. (1958). «Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia». *Am. J. Anat.*, núm. 102, p. 365-410.
- HAMBURGER, V. (1977). «The developmental history of the motor neuron». *Neurosci. Res. Progr. Bull.*, núm. 15 (supl.), p. 1-37.
- JACKSON, M.; LLADÓ, J.; ROTHSTEIN, J. D. (2002). «Therapeutic developments in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis». *Expert Opin. Investig. Drugs*, núm. 11, p. 1-22.
- JULIEN, J. P. (2001). «Amyotrophic lateral sclerosis: Unfolding the toxicity of misfolded». *Cell*, núm. 104, p. 581-591.
- KOSTIC, V.; JACKSON-LEWIS, V.; DE BILBAO, F.; DUBOIS-DAUPHIN, M.; PRZEDBORSKI, S. (1997). «Bcl-2: Prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis». *Science*, núm. 277, p. 559-562.
- KROEMER, G.; REED, J. C. (2000). «Mitochondrial control of cell death». *Nat. Med.*, núm. 6, p. 513-519.
- LIN, C. L.; BRISTOL, L. A.; JIN, L.; DYKES-HOBERG, M.; CRAWFORD, T.; CLAWSON, L.; ROTHSTEIN, J. D. (1998). «Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis». *Neuron*, núm. 20, p. 589-602.
- LINDBERG, M. J.; TIBELL, L.; OLIVEBERG, M. (2002). «Common denominator of Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis: decreased stability of the apo state». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 99, p. 16607-16612.
- LINO, M. M.; SCHNEIDER, C.; CARONI, P. (2002). «Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease». *J. Neurosci.*, núm. 22, p. 4825-4832.
- LLADÓ, J.; CALDERÓ, J.; RIBERA, J.; TARABAL, O.; OPPENHEIM, R. W.; ESQUERDA, J. E. (1999). «Opposing effects of excitatory amino acids on chick embryo spinal cord motoneurons: excitotoxic degeneration or prevention of programmed cell death». *J. Neurosci.*, núm. 19, p. 10803-10812.
- MARTIN, L. J. (1999). «Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible

- contribution of a programmed cell death mechanism». *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, núm. 5, p. 459-471.
- MIGHELLI, A.; ATZORI, C.; PIVA, R.; TORTAROLO, M.; GIRELLI, M.; SCHIFFER, D.; BENDOTTI, C. (1999). «Lack of apoptosis in mice with ALS». *Nature Medicine*, núm. 5, p. 966-967.
- MILLECAMPS, S.; NICOLLE, D.; CEBALLOS-PICOT, I.; MALLET, J.; BARKATS, M. (2001). «Synaptic sprouting increases the uptake capacities of motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 98, p. 7582-7587.
- MOURELATOS, Z.; GONATAS, N. K.; STIEBER, A.; GURNEY, M. E.; DAL CANTO, M. C. (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». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 87, p. 4393-4395.
- MOURELATOS, Z.; HIRANO, A.; ROSENQUIST, A. C.; GONATAS, N. K. (1994). «Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Clinical studies in ALS of Guam and experimental studies in deafferented neurons and in beta,beta'iminodipropionitrile axonopathy». *Am. J. Pathol.*, núm. 144, p. 1288-1300.
- NGUYEN, M. D.; LARIVIERE, R. C.; JULIEN, J. P. (2001). «Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions». *Neuron*, núm. 30, p. 135-147.
- NISHI, M.; HINDS, H.; LU, H. P.; KAWATA, M.; HAYASHI, Y. (2001). «Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner». *J. Neurosci.*, núm. 21, RC 185, p. 1-6.
- OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. (2002). «Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 99, p. 9010-9014.
- OKAMOTO, K. (1996) «Morphology and presumable morphogenesis of Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis». A: NAKANO, I.; HIRANO, A. [ed.]. *Amyotrophic lateral sclerosis: Progress and perspectives in basic research and clinical application*. Amsterdam: Elsevier Science, p. 40-47.
- OKAMOTO, K.; HIRAI, S.; AMARI, M.; WATANABE, M.; SAKURAI, A. (1993). «Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis immunostained with rabbit anti-cystatin C serum». *Neurosci. Lett.*, núm. 162, p. 125-128.
- OPPENHEIM, R. W. (1991). «Cell death during development of the nervous system». *Annu. Rev. Neurosci.*, núm. 14, p. 453-501.
- OPPENHEIM, R. W.; CALDERÓ, J.; CIUTAT, D.; ESQUERDA, J. E.; AYALA, V.; PREVETTE, D.; WANG, S. (2003). «Rescue of developing spinal motoneurons from programmed cell death by the GABAA agonist muscimol acts by blockade of neuromuscular activity and increased intramuscular nerve branching». *Mol. Cell. Neurosci.* [En premsa]
- OPPENHEIM, R. W.; CALDERÓ, J.; ESQUERDA, J. E.; GOULD, T. W. (2001). «Target-independent programmed cell death in the developing nervous system». A: KALVERBOER, A. F.; GRAMSBERGEN, A. [ed.]. *Handbook of brain and behaviour in human development*. Groningen: Kluwer Academic Press, p. 343-407.
- OPPENHEIM, R. W.; CHU-WANG, I. W.; MADERDRUT, J. L. (1978). «Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. III. The differentiation of motoneurons prior to their induced degeneration following limb-bud removal». *J. Comp. Neurol.*, núm. 177, p. 87-112.

- PATZKE, H.; TSAI, L. H. (2002). «Cdk5 sinks into ALS». *Trends Neurosci.*, núm. 5, p. 8-10.
- PERICAK-VANCE, M.; HENTATI, F.; SIDDIQUE, T. (2001). «The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis». *Nat. Genet.*, núm. 29, p. 160-165.
- RAOUL, C.; ESTEVEZ, A. G.; NISHIMUNE, H.; CLEVELAND, D. W.; DELAPEYRIERE, O.; HENDERSON, C. E.; HAASE, G.; PETTMANN, B. (2002). «Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas potentiation by ALS-linked SOD1 mutations». *Neuron*, núm. 35, p.1067-1083.
- RIBERA, J.; AYALA, V.; ESQUERDA, J. E. (2002). «c-Jun-like immunoreactivity in apoptosis is the result of a crossreaction with neoantigenic sites exposed by caspase-3-mediated proteolysis». *J. Histochem. Cytochem.*, núm. 50, p. 961-972.
- ROSA, J. L.; BARBACID, M. (1997). «A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70». *Oncogene*, núm. 15, p. 1-6.
- ROSA, J. L.; CASAROLI-MARANO, R. P.; BUCKLER, A. J.; VILARO, S.; BARBACID, M. (1996). «p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins». *EMBO J.*, núm. 15, p. 4262-4273.
- ROTHSTEIN, J. D. (1996). «Therapeutic horizons for amyotrophic lateral sclerosis». *Curr. Op. Neurobiol.*, núm. 6, p. 679-687.
- ROTHSTEIN, J. D.; MARTIN, L. J.; KUNCL, R. W. (1992). «Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis». *N. Eng. J. Med.*, núm. 326, p. 1464-1468.
- ROTHSTEIN, J. D.; TSAI, G.; KUNCL, R. W.; CLAWSON, L.; CORNBATH, D. R.; DRACHMAN, D. B.; PESTRONK, A.; STAUCH, B. L.; COYLE, J. T. (1990). «Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis». *Ann. Neurol.*, núm. 28, p. 18-25.
- SCHWARTZ, M. S.; SWASH, M. (1995). «Neurophysiological changes in motor neuron disease». A: LEIGH, P. N.; SWASH, M. [ed.]. *Motor neuron disease*. Berlín: Springer-Verlag, p. 331-343.
- SHAW, P. J. (2001). «Genetic inroads in familial ALS». *Nat. Genet.*, núm. 2, p. 103-104.
- SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B. E.; BROTHERS, G. M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEFFLER, M.; LAROCLETTE, N.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R.; SIDEROVSKI, D. P.; PENNINGER, J. M.; KROEMER, G.; SUSIN, S. A. (1999). «Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor». *Nature*, núm. 397, p. 441-446.
- TARABAL, O.; CALDERÓ, J.; LLADÓ, J.; OPPENHEIM, R. W.; ESQUERDA, J. E. (2001). «Long-lasting aberrant tubulovesicular membrane inclusions accumulate in developing motoneurons after a sublethal excitotoxic insult: a possible model for neuronal pathology in neurodegenerative disease». *J. Neurosci.*, núm. 21, p. 8072-8081.
- WINSECK, A. K.; CALDERÓ, J.; CIUTAT, D.; PREVETTE, D.; SCOTT, S. A.; WANG, G.; ESQUERDA, J. E.; OPPENHEIM, R. W. (2002). «In vivo analysis of Schwann cell programmed cell death in the embryonic chick: regulation by axons and glial growth factor». *J. Neurosci.*, núm. 22, p. 4509-4521.

- WRATHALL, J. R.; CHOINIERE, D.; TENG, Y. D. (1994). «Dose-dependent reduction of tissue loss and functional impairment after spinal cord trauma with the AMPA/kainate antagonist NBQX». *J. Neurosci.*, núm. 14, p. 6598-6607.
- YANG, Y.; HENTATI, A.; DENG, H. X.; DABBAGH, O.; SASAKI, T.; HIRANO, M.; HUNG, W. Y.; OUAHCHI, K.; YAN, J.; AZIM, A. C.; COLE, N.; GASCON, G.; YAGMOUR, A.; BEN-HAMIDA, M.; PERICAK-VANCE, M.; HENTATI, F.; SIDDIQUE, T. (2001). «The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis». *Nat. Genet.*, núm. 29, p. 160-165.



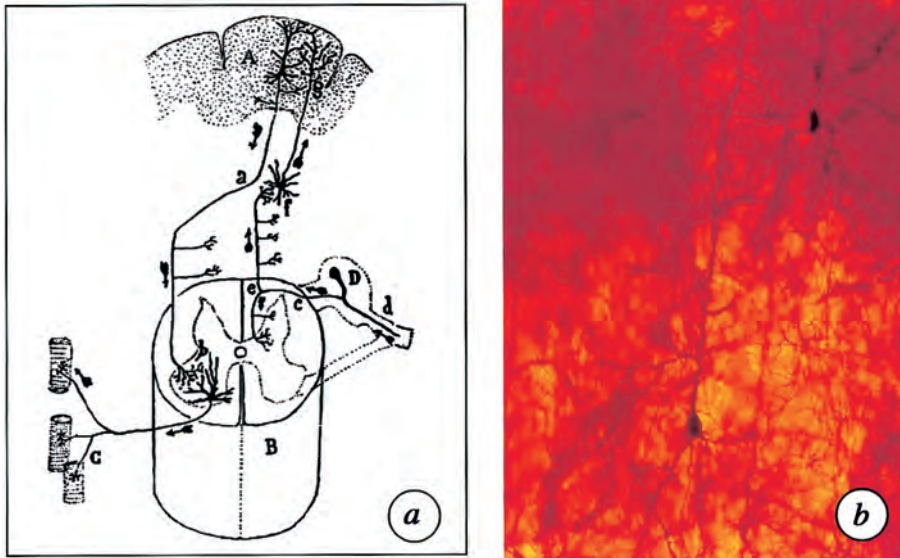


FIGURA 1. *a*) Esquema segons Ramón y Cajal de la «marcha de las incitaciones motrices voluntarias y de las sensitivas conscientes» en el qual s'assenyala clarament la primera neurona a l'escorça cerebral (A) que empalma amb la segona neurona a la banya anterior de la medul·la espinal (B), la qual acaba sobre les fibres musculars (C). Aquestes són les estructures cel·lulars que sofreixen degeneració a l'ELA. Cal tenir en compte que aquest esquema fou publicat l'any 1899 en la seva obra *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, en una època en la qual el concepte de *sinapsi* encara no era vigent. *b*) Fotografia recent d'una preparació histològica original de Santiago Ramón y Cajal corresponent al cervell de rata impregnat amb el mètode de Golgi i en la qual es veu una neurona piramidal de l'escorça cerebral que es correspondria amb la neurona A de l'esquema.

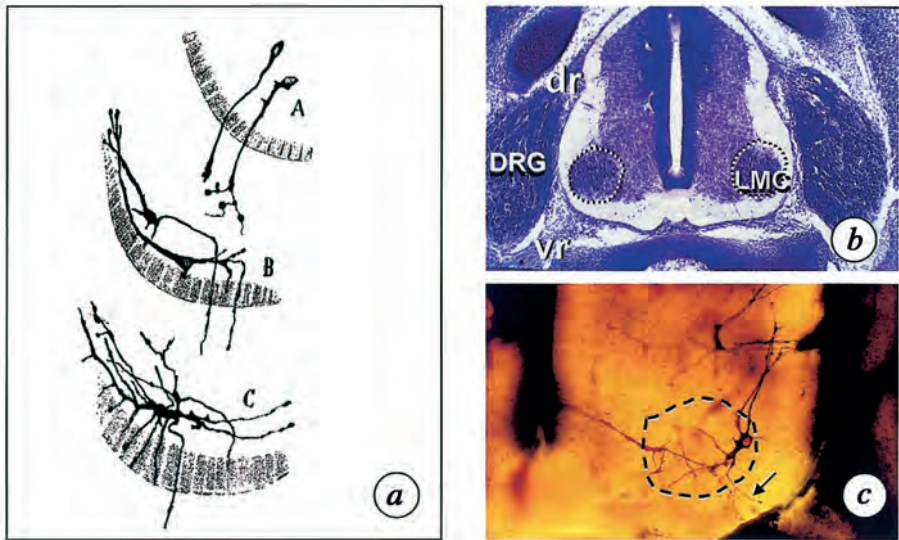
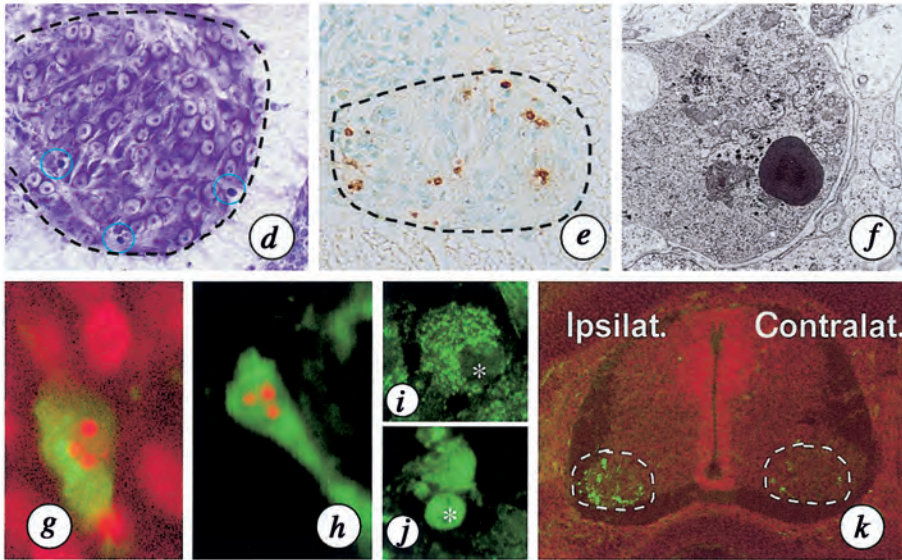


FIGURA 2. *a*) Dibuix realitzat per Santiago Ramón y Cajal que representa el desenvolupament d'una neurona motora en la medul·la espinal de l'embrió de pollastre de tres, quatre i cinc dies d'incubació. Aquestes neurones es formen en etapes molt primerenques i ben aviat adquireixen una bona diferenciació de les seves prolongacions dendrítiques i axonals ben patents en embrions de cinc dies. El procés de mort cel·lular programada començarà a partir d'aquest moment i coincidirà amb la sinaptogènesi neuromuscular. *b*) Secció d'una medul·la espinal d'embrió de pollastre E6 en la qual s'observen les agrupacions de MN que constitueixen la columna motora ventral lateral (LMC); es veu també l'arrel nerviosa ventral (vr) i dorsal (dr), i el gangli raquidi (DRG). *c*) Secció de medul·la espinal d'embrió de pollastre E6 tractada segons el mètode de Golgi en la qual es mostra una MN de la banya anterior amb les seves dendrites i el seu axó (fletxa) sortint de la medul·la. *d*)-*k*) MN en apoptosi natural a la LMC d'embrions de pollastre E7 que mostren la característica de la picnosi (encerclada en *d*), la reactivitat a TUNEL (cèl·lules marrons en *e*) i la ul-



traestructura, en la qual s'aprecia la gran condensació de la cromatina i la relativa integritat dels orgànuls citoplasmàtics i de la membrana cel·lular (*f*). També es mostra en *g*) l'associació entre l'activació de caspasa-3 (verd) i la picnosi mostrada per la tinció conjunta del DNA amb el iòduri de propidi (vermell). En *h*) es veu conjuntament l'activació de caspasa-3 (verd) amb la reacció de TUNEL. En *i*) i *j*) es mostra la immunoreactivitat pel citocrom c en una MN normal (*i*) que presenta un patró clarament granular a conseqüència de la seva localització mitocondrial, que es torna difús en la MN apoptòtica (*j*) a causa de la sortida cap al citoplasma. L'asterisc assenyalava la part fosca de la cèl·lula corresponent al nucli. En *k*) es mostra una secció de medulla espinal d'un embrió de pollastre E7 al qual es va eliminar l'esbós de la pota d'un costat a l'E2. La tinció immunohistoquímica posa de manifest l'activitat de la caspasa-3 (verd), la qual és present en nombroses MN del costat operat a causa de la mort massiva de MN induïda per l'absència de diàna muscular a innervar.

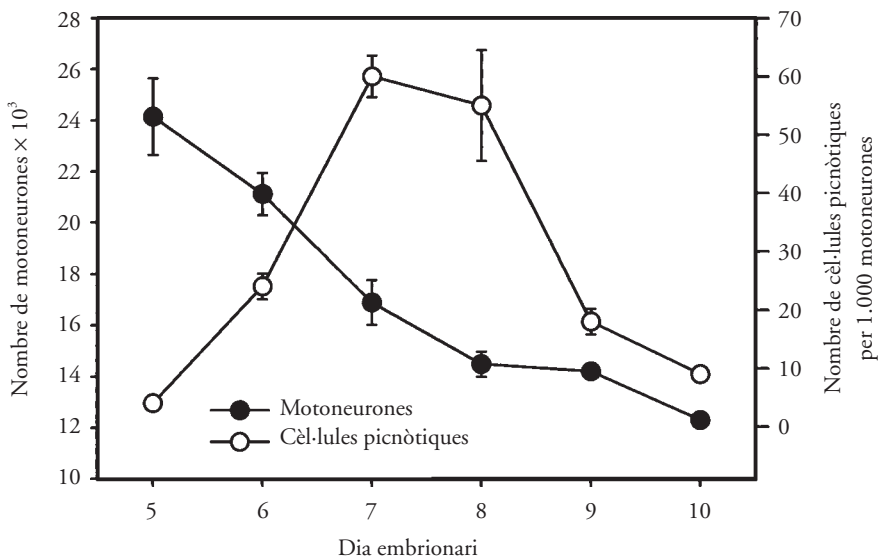


FIGURA 3. Perfil del nombre total de MN en la columna motora lateral lumbar durant el desenvolupament de l'embrió de pollastre. Hom pot observar el descens gradual del nombre de MN entre l'E5 i l'E10 degut a l'eliminació natural d'una part d'aquestes MN per mort cel·lular programada. També s'ha quantificat la densitat de neurones picnòtiques que indica la quantitat de mort cel·lular, la qual és màxima al bell mig del període (entre l'E7 i l'E8).

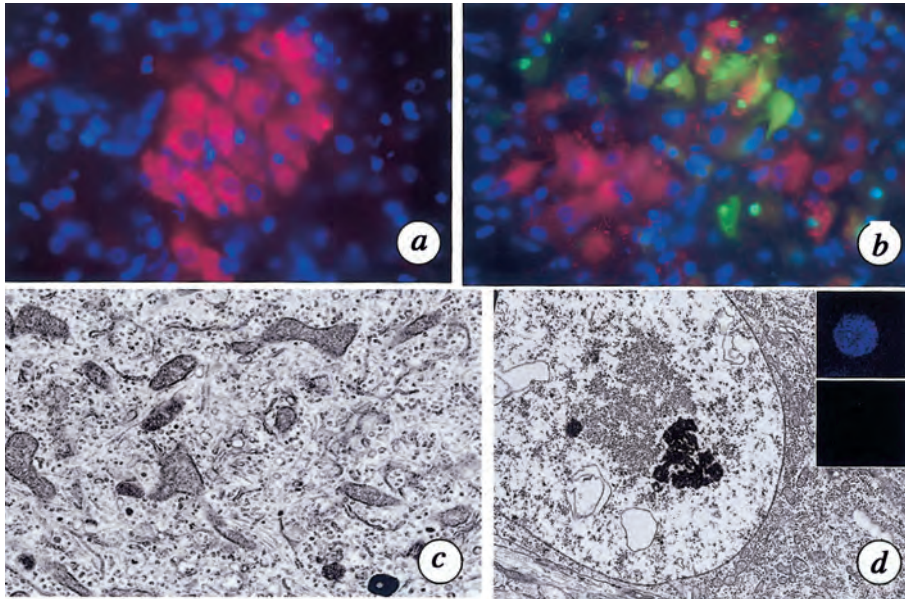
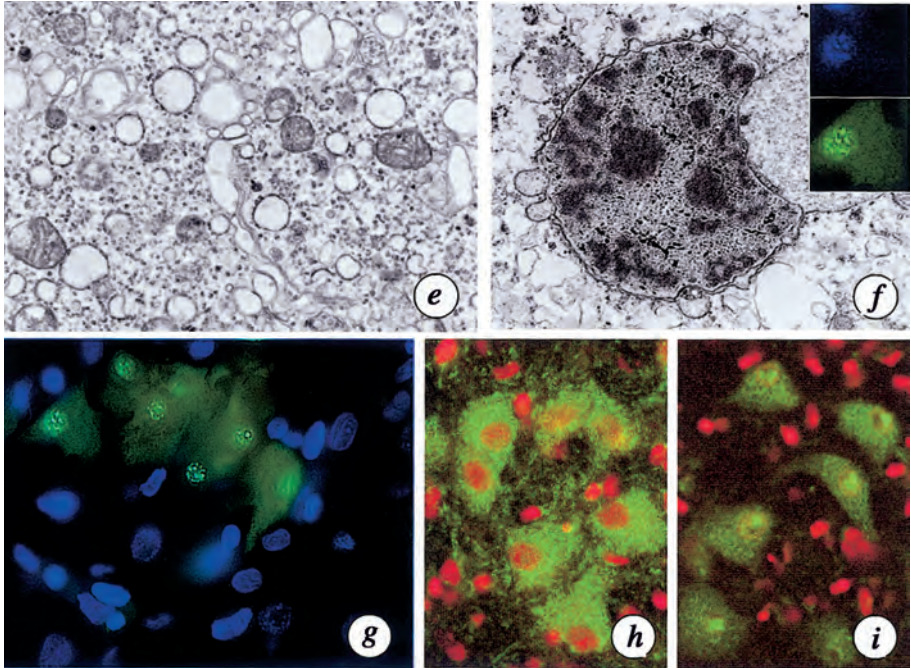


FIGURA 4. *a) i b)* Grup de MN d'un embrió de pollastre E10 sis hores després de l'administració *in ovo* de 0,1 mg de kaïnata (*a*) o bé de 0,1 mg de NMDA (*b*). S'ha fet un marcatge múltiple fluorescent per a posar en evidència el DNA total (blau), el DNA fragmentat (TUNEL, verd) i el neuropèptid propi d'algunes MN CGRP (vermell). El kaïnata a aquesta dosi no provoca mort excitotòxica aguda i, per tant, les MN no contenen DNA fragmentat. Per contra, després de l'administració de NMDA algunes neurones mostren una cromatina condensada en petits grumolls i una reacció TUNEL positiva (verd), que s'estén també al citoplasma per la ruptura de l'embolcall nuclear. *c)-f)* Imatges de microscòpia electrònica de MN d'embrió de pollastre E10 control (*c i d*) i hores després de rebre un insult excitotòxic letal per l'NMDA (*e i f*). Hom pot apreciar la gran alteració en el citoplasma induïda per l'NMDA amb la desorganització dels compartiments membranis del citoplasma que sofreixen una extensa fragmentació i microvacuolització que s'estén fins a l'embolcall nuclear, el qual es



troba molt vacuolitzat. La cromatina està condensada formant grumolls dispersos distintes de les masses compactes de cromatina condensada pròpies de l'apoptosi. *g*) El doble marcatge del DNA total amb DAPI (blau) i el DNA fragmentat amb TUNEL (verd) observat amb microscòpia de fluorescència amb més resolució ens demostra la colocalització de la cromatina condensada, que forma petits grànuls amb el DNA fragmentat en una necrosi excitotòxica aguda induïda per NMDA. Aquestes imatges correlacionen molt bé amb l'organització ultraestructural de la cromatina en situacions equivalents (quadres inserits en *d* i *f*). *g*) i *h*) Mostren un immunomarcatge per AIF (verd) combinat amb la tinció del DNA mitjançant DAPI en seccions de la columna motora lateral d'embrions E10 controls i estimulats amb NMDA observades en un microscopi confocal. En *h*) es veu la localització citoplasmàtica de l'AIF en neurones normals amb un patró granular propi de la seva localització als mitocondris, i en *i*), la seva translocació cap al nucli, sis hores després de l'aplicació de l'NMDA.

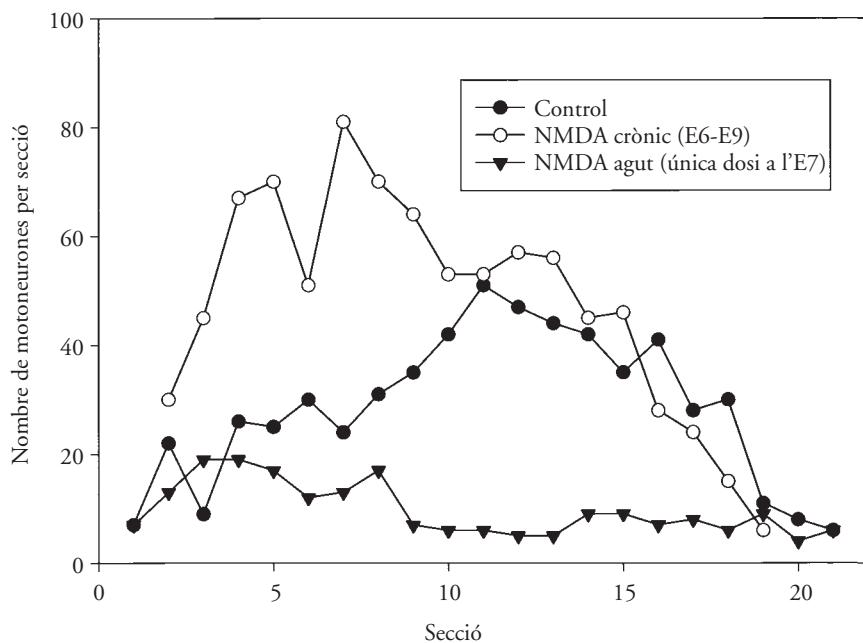


FIGURA 5. Nombre de MN a la banya anterior de la medulla espinal en sections seriades al llarg de l'engruiximent lumbo-sacre d'embrions de pollastre E10 en embrions controls i després d'un tractament amb una única dosi de NMDA a l'E7, o bé amb repetides dosis entre l'E5 i l'E9. Com és previsible, després de la necrosi excitotòxica induïda per l'única dosi de NMDA a l'E7, els embrions mostren una pèrdua massiva de MN. Paradoxalment, un tractament crònic amb NMDA iniciat a l'E5 i perllongat fins a l'E9, no solament no provoca cap depleció de MN sinó que el nombre de MN a l'E10 és fins i tot superior als controls. Això és degut al fet que el tractament crònic ha provocat una lesió a les MN que comporta incompetència per a desenvolupar l'apoptosi natural durant el període normal de mort programada de MN entre l'E5 i l'E10.

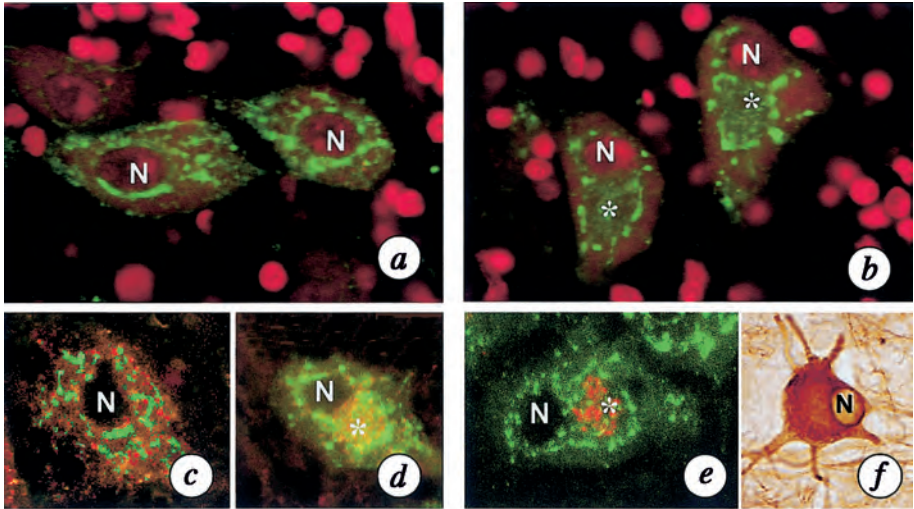
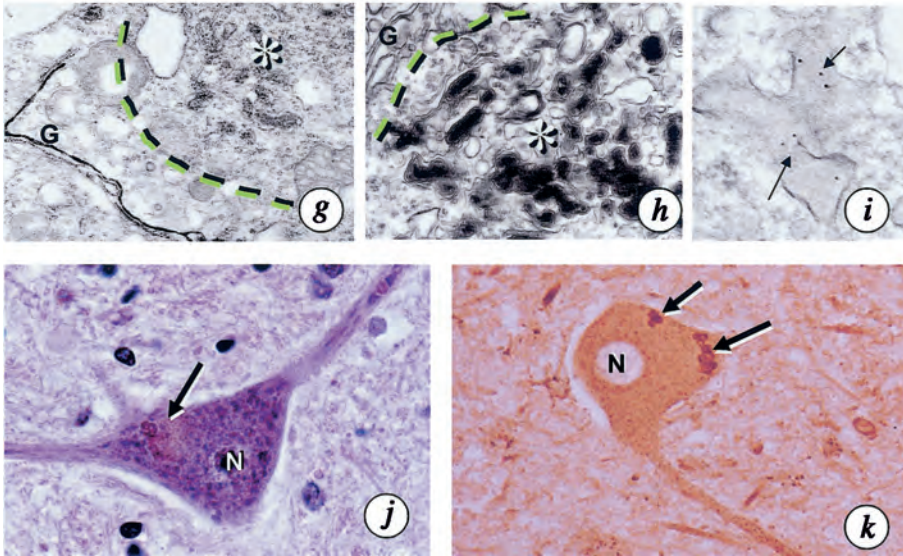


FIGURA 6. *a*) i *b*) MN d'embrions de pollastre E16 controls (*a*) i després del tractament crònic amb NMDA entre l'E5 i l'E9 (*b*) que mostren un doble marcatge fluorescent pel CGRP (verd) i pel DNA amb iodur de propidi. La N assenyalen els nuclis. El CGRP delimita l'aparell de Golgi, que té una disposició dispersa per tot el soma neuronal en *a*), però que està redistribuït delimitant una regió paranuclear nova en *b*), marcada amb un asterisc. Observeu la distribució normal de la cromatina en ambdós casos amb l'absència de picnosi o de condensació anormal. *c*) i *d*) Doble immunomarcatge pel CGRP (verd) i per la cistatina-C en MN normals (*c*) i després del tractament crònic amb NMDA que mostra la concentració de grànuls de cistatina-C en l'estructura delimitada per Golgi i marcada amb un asterisc (*d*). *e*) Doble immunomarcatge pel CGRP (verd) i per la proteïna HERG1 (vermell) que mostra la concentració d'aquesta proteïna a l'interior de l'estructura delimitada amb l'asterisc. *f*) Immunomarcatge pel neurofilament fosforilat que mostra una forta positivitat en una MN després del tractament crònic amb NMDA. *g*-*i*) La regió de





nova formació induïda pel tractament crònic amb NMDA i encerclada per l'aparell de Golgi es mostra ultraestructuralment en forma d'estructures tubulovesiculars acumulades a la regió del *trans-Golgi*, com es pot observar en *g*) després del marcatge del Golgi amb una reacció enzimocitoquímica per la TPPassa. Les línies discontinües mostren la separació entre el Golgi i aquestes estructures i faciliten la correlació amb les imatges fluorescents anteriors. Les estructures tubulovesiculars evolucionen cap a formes més electrodenses i envoltades per membranes, tal com es pot veure en *h*), que correspon a una MN d'un embrió E18 després del tractament crònic amb NMDA (entre l'E5 i l'E9). En *i*) es pot veure un immunomarcatge ultraestructural amb partícules d'or col·loidal de 10 nm (fletxes) que demostren la presència d'immunoreactivitat per la proteïna HERG1 en l'interior de les estructures tubulovesiculars. *j*) i *k*) MN procedents de la medulla espinal d'un pacient amb ELA que mostren les típiques inclusions eosinofíliques de Bunina (fletxes) en *j*), i la seva immunopositivitat per la cistatina-C en *k*).