

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

ARXIU DE LES SECCIONS DE CIÈNCIES, CXXXIV  
SECCIÓ DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES



**UNA MOSTRA  
DE LA BIOLOGIA I LA PATOLOGIA  
CEL·LULARS DEL SISTEMA NERVIÓS  
A CATALUNYA**

*CENT CINQUANTÈ ANIVERSARI DEL NAIXEMENT DE SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL*



UNA MOSTRA DE LA BIOLOGIA  
I LA PATOLOGIA CEL·LULARS  
DEL SISTEMA NERVIÓS A CATALUNYA

CENT CINQUANTÈ ANIVERSARI DEL NAIXEMENT  
DE SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL



INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

ARXIU DE LES SECCIONS DE CIÈNCIES, CXXXIV  
SECCIÓ DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

UNA MOSTRA DE LA BIOLOGIA  
I LA PATOLOGIA CELLULARS  
DEL SISTEMA NERVIÓS A CATALUNYA

CENT CINQUANTÈ ANIVERSARI DEL NAIXEMENT  
DE SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL

BARCELONA  
2003

Biblioteca de Catalunya. Dades CIP

Una Mostra de la biologia i la patologia cel·lulars del sistema nerviós a Catalunya : cent cinquantè aniversari del naixement de Santiago Ramón y Cajal. — (Arxius de les seccions de ciències / Institut d'Estudis Catalans, Secció de Ciències Biològiques ; 134)  
Text en català, resum en anglès. — Bibliografia  
ISBN 84-7283-689-4  
I. Durfort i Coll, Mercè, ed. II. Ramón y Cajal, Santiago III. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques IV. Col·lecció: Arxius de les seccions de ciències ; 134  
1. Sistema nerviós — Citopatologia — Congressos  
2. Sistema nerviós — Degeneració — Congressos 3. Neurobiologia — Congressos  
616-8-003.8(061.3)

L'edició d'aquesta obra  
ha estat a cura de Mercè Durfort,  
membre de l'Institut d'Estudis Catalans

Disseny de la sobrecoberta: Maria Casassas

La Secció agraeix a la senyora Edith Schaar, autora del quadre que apareix a la sobrecoberta, la gentilesa que ha tingut per la cessió d'aquesta pintura.

© els autors de les ponències  
© 2003, Institut d'Estudis Catalans, per a aquesta edició  
Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: novembre de 2003  
Tiratge: 600 exemplars

Text revisat lingüísticament per l'Oficina de Correcció i Assessorament Lingüístics de l'IEC

Compost per fotocomposició gama, s. l.  
Carrer d'Arístides Maillol, 3, 1r. 08028 Barcelona

Imprès a Limpergraf, SL  
Polígon industrial Can Salvatella. Carrer de Mogoda, 29-31. 08210 Barberà del Vallès

ISBN: 84-7283-689-4  
Dipòsit Legal: B. 45005-2003

Són rigorosament prohibides, sense l'autorització escrita dels titulars del *copyright*, la reproducció total o parcial d'aquesta obra per qualsevol procediment i suport, incloent-hi la reprografia i el tractament informàtic, la distribució d'exemplars mitjançant lloguer o préstec comercial, la inclusió total o parcial en bases de dades i la consulta a través de xarxa telemàtica o d'Internet. Les infraccions d'aquests drets estan sotmeses a les sancions establertes per les lleis.

## TAULA

Introducció, <i>per Mercè Durfort i Coll</i>	7
Creixement i regeneració neuronal: cent anys després de Ramón y Cajal, <i>per Xavier Fontana, José A. del Río, Fernando de Castro i Eduardo Soriano</i>	9
El procés degeneratiu de les motoneurons espinals en l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) estudiat en un model experimental d'excitotoxicitat per glutamat, <i>per Josep E. Esquerda, Jordi Calderó, Anna Casanovas, Dolors Ciutat, Celia Casas, Joan Ribera i Olga Tarabal</i>	27
La funció del zinc en el sistema nerviós en condicions normals i patològiques, <i>per Jesús Pérez i Clausell</i>	53
Les neurotoxines clostridials com a eines moleculars i terapèutiques, <i>per Joan Blasi, Mireia Martín-Satué, Ashraf Muhaisen, Adriana Raptis, Àlex Soler i Benjamín Torrejón-Escribano</i>	77





# INTRODUCCIÓ

Mercè Durfort i Coll

*Membre de la Secció de Ciències Biològiques*

Don Santiago Ramón y Cajal (Petilla de Aragón, 1852 - Madrid, 1934), guanyà la Càtedra d'Histologia i Histoquímica Normals i Anatomia Patològica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. El seu nomenament es publicà el 2 de novembre de 1887 i prengué possessió el 12 de desembre d'aquell mateix any. Va quedar-se a Barcelona fins al 1892, any que guanyà la Càtedra de la mateixa denominació de la Universitat de Madrid.

Durant els cinc anys que visqué a la Ciutat Comtal publicà freqüentment a la *Gaceta Médica Catalana* (abans *Gaceta Médica de Catalunya*) i a la *Revista de Ciencias Médicas de Barcelona*. L'any 1889 va aparèixer la primera edició del seu *Manual de anatomía patológica general* i el 1891, imprès a la Casa Provincial de la Caritat, publicà *Pequeñas contribuciones al conocimiento del sistema nervioso*, una síntesi dels seus treballs originals i una recopilació de les dades que es tenien fins aleshores del sistema nerviós.

L'any 1888 va ser, segons ell mateix escriu en la seva autobiografia, el seu «año cumbre», ja que és justament quan va postular *la teoria neuronal*, fet cabdal en neurobiologia.

En deixar Barcelona (1892) per prendre possessió de la Càtedra de la mateixa denominació de la Facultat de Medicina de Madrid, va mantenir-se en contacte amb diverses personalitats del món acadèmic i intel·lectual de Barcelona.

En el volum 1 dels *Treballs de la Societat de Biologia* (1913) publicat per l'Institut d'Estudis Catalans sota la direcció d'August Pi i Suñer, en el llistat de socis honoraris, trobem en segon lloc, després d'Enric Prat de la Riba, Santiago Ramón y Cajal (Madrid); també hi consta Odón de Buen (Madrid), que també havia estat un destacat professor de la Facultat de Ciències de la Universitat de Barcelona.

És fonamentalment per aquesta vinculació amb la Societat de Biologia de Barcelona de l'IEC que en commemorar-se el cent cinquantè aniversari del seu naixement, la Secció de Ciències Biològiques va celebrar una sessió acadèmica per homenatjar una vegada més l'il·lustre neurohistòleg.

Volem deixar constància d'aquest esdeveniment publicant les ponències que vàrem encomanar a quatre neurobiòlegs de la comunitat científica catalana que des de fa anys desenvolupen una tasca molt meritòria en l'estudi de la textura del teixit nerviós.

# CREIXEMENT I REGENERACIÓ NEURONAL: CENT ANYS DESPRÉS DE RAMÓN Y CAJAL

Xavier Fontana, José A. del Río i Eduardo Soriano

*Departament de Biologia Cel·lular*

*Parc Científic de Barcelona. Universitat de Barcelona*

Fernando de Castro

*Institut de Neurociències de Castella i Lleó (INCYL). Universitat de Salamanca*

## INTRODUCTION

This presentation, in commemoration of the 150 anniversary of the birth of the Spanish neuroscientist Santiago Ramón y Cajal (1852, Petilla de Aragón), and being part of the conferences organized by Institut d'Estudis Catalans in Barcelona, on November of 2002, discusses about some of the main contributions made by this scientist.

Using this as a fertile substratum, we emphasize on the current knowledge about the mechanisms of axonal pathfinding during development. Furthermore, we discuss about the implication of axonal navigation molecules in regeneration and finally we focus on how these molecules interact to configure the specific connection patterns found in the entorhino-hippocampal subsystem.

## CONTRIBUCIONS FONAMENTALS DE SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL

Els rigorosos i innovadors mètodes d'observació histològica del sistema nerviós utilitzats per aquest científic espanyol, guardonat amb el Premi Nobel de Medicina l'any 1906, junt amb la seva gran capacitat d'abstracció i imaginació, configuraren un cos de coneixement que, després de dissipar la boira que envoltava les discussions científiques sobre el sistema nerviós fa cent anys, donà un nou i encertat rumb a la neurociència fins a arribar a l'actualitat.

La potència del sistema nerviós radica en l'establiment de patrons de connexions altament estereotipats que formen xarxes neuronals. Aquesta connectivitat cel·lular

s'integra anatòmicament i configura grans vies de connexió entre les diferents àrees cerebrals. Això planteja la qüestió de com aquesta arquitectura histològica es pot construir durant el desenvolupament, ja que cada neurona ha d'especificar la seva diana sinàptica. Ramón y Cajal va aconseguir un avenç significatiu en aquesta qüestió: primer, amb la identificació, l'any 1890, de l'estructura terminal de l'axó, el conus de creixement (figura 1), i després amb la formulació de la hipòtesi neurotròfica, l'any 1892.

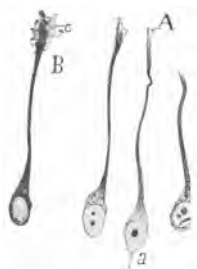


FIGURA 1. Dibuix que mostra l'estructura terminal de diversos axons neuronals. [Dibuix extret de S. Ramón y Cajal, *Études sur la neurogenèse de quelques vertébrés*, Madrid, 1929]

Posteriorment, s'ha demostrat que és el conus de creixement el responsable d'integrar el conjunt de senyals químics que aquest es troba durant la seva elongació i l'establiment sinàptic en el transcurs del desenvolupament.

Durant el desenvolupament, i a través d'una sèrie de processos tals com la proliferació, la migració, l'elongació axonal i la sinaptogènesi, s'evoluciona morfològicament des d'un neuroepiteli fins al cervell adult (figura 2).

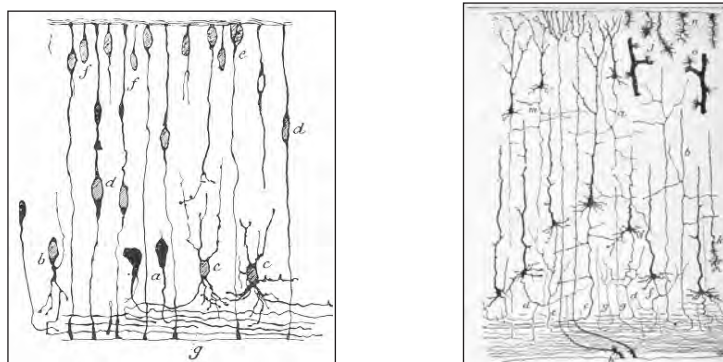


FIGURA 2. Làmines que mostren l'evolució anatòmica i estructural des d'un neuroepiteli incipient fins a obtenir una distribució estereotipada de l'escorça cerebral en capes. Vegeu el canvi de morfologia cel·lular, des de neuroblasts migratoris, amb unes prolongacions molt rudimentàries, fins a neurones piramidals madures i funcionals, amb unes neurites profusament ramificades. [Adaptat de S. Ramón y Cajal, *Études sur la neurogenèse de quelques vertébrés*, Madrid, 1929]

Cal destacar que Ramón y Cajal, armat tan sols amb tècniques histològiques que li permetien una visió estàtica del sistema nerviós *post mortem*, fou capaç d'atansar-se al funcionament del sistema nerviós i de postular encertats principis fisiològics combinant imaginació amb raonaments deductius. Teories com la «polarització dinàmica» o la idea de la constant remodelació del sistema nerviós i la hipòtesi connectivista del coneixement en són exemples brillants:

- La polarització dinàmica implica que l'impuls elèctric es propaga en un únic sentit pre-postsinàptic (actualment se sap que existeixen certs tipus de comunicació no elèctrica en sentit post-presinàptic), i per tant, seguint la seqüència bàsica dendrita-soma-axó//dendrita-soma-axó. Avui dia es coneix que tot i ser un principi general, també existeixen sinapsis axó//axó i axó//soma neuronal.
- La gran versatilitat del cervell, l'adaptació als canvis i el ràpid aprenentatge han d'obeir a alguna espècie de remodelació anatòmica nerviosa. Ramón y Cajal va intuir aquesta plasticitat en forma de canvis en la morfologia cel·lular tant de dendrites com d'axons. La profunditat de la interacció entre els terminals sinàptics seria, doncs, dependent de l'ús-desús d'aquella via nerviosa.

Aquestes idees, sumades a altres d'igualmente esclaridores i bàsiques com la doctrina neuronal, que descriu la naturalesa del cervell en termes d'individualitat i contigüïtat cel·lular, no pas continuïtat, permeten que a continuació pugueu llegir els coneixements que es tenen avui dia sobre les molècules implicades en la navegació axonal.

## INTRODUCCIÓ A LES MOLÈCULES DE GUIA AXONAL

Un dels reptes més estimulants als quals s'enfronta actualment la neurobiologia és poder explicar i identificar els mecanismes moleculars responsables de la formació de connexions nervioses en els sistemes nerviosos central (SNC) i perifèric (SNP).

El cervell dels mamífers conté aproximadament  $10^{12}$  neurones, les quals durant el desenvolupament estenen axons a través de grans distàncies seguint rutes específiques cap a les seves dianes. La formació de connexions nervioses està integrada tant per processos d'elongació axonal com també de retracció, i ambdós són crucials per a la navegació axonal a través del parènquima nerviós.

Mentre succeeix aquest procés de guia axonal, l'extrem terminal de l'axó, anomenat *conus de creixement*, explora l'entorn extracel·lular que l'envolta, tant la ma-

triu extracel·lular com la superfície d'altres cèl·lules, alhora que respon i és sensible a una gran diversitat de senyals de guia (Giger i Kolodkin, 2001).

D'ençà del sorgiment de la hipòtesi quimiotròfica, s'ha acumulat un cabal important d'informació referent a la identificació i caracterització dels senyals que influencien la guia i el creixement axonal, de tal manera que s'ha identificat un nombre creixent de famílies de lligands i receptors. Aquestes molècules poden classificar-se a grans trets en funció del seu rang espacial d'influència i de l'acció que exerceixen sobre el conus de creixement. Així, trobem molècules d'ampli rang d'influència, de caràcter difusible, i també d'un rang estret d'influència, no difusibles o associades a la membrana plasmàtica. A més, poden exercir un paper inhibidor/repulsiu o bé no inhibidor/attractiu (Tessier-Lavigne i Goodman, 1996). Aquesta acció no és mútuament exclouent, de manera que una mateixa molècula pot desencadenar efectes repulsius o atractius depenent de l'ambient molecular i de la dotació en receptors del conus de creixement.

Per tant, existeix una regulació combinatorial formada per gran diversitat de lligands i receptors, i la integració de tots aquests senyals condueix al fenomen de la guia axonal (Yu i Bargmann, 2001). Estudis addicionals mostren que les molècules de guia axonal i els seus receptors estan sotmesos a regulació transcripcional i post-transcripcional, fet que genera un gran ventall de respostes axonals i neuronals.

És d'esperar que les vies de transducció activades per aquestes molècules de guia axonal repercutixin directament o indirecta en el citoesquelet cel·lular. Per tant, les respostes d'atracció/repulsió axonal, migració cel·lular, arborització i d'altres efectes provocats per aquestes molècules obeeixen a una regulació dinàmica dels components fibril·lars a través d'intrincades xarxes de transducció i a la regulació de les molècules d'adhesió intercel·lular i d'associació amb la matriu extracel·lular.

Les molècules de guia han estat implicades no només en aquests fenòmens de guia sinó també en la regulació d'altres processos biològics com la migració cel·lular, la morfogènesi d'òrgans o l'angiogènesi.

L'expressió de la majoria d'aquestes molècules està regulada durant el desenvolupament, i algunes són presents en l'SNC adult, on es poden reexpressar per cèl·lules no neuronals en el cas que es produeixin lesions. Tot i que la seva funció en l'adult no és ben compresa, se'ls atribueix un paper en la plasticitat del sistema nerviós.

A continuació ens centrarem en les funcions específiques de quatre famílies conservades de molècules de guia axonal: netrines, slit, semaforines i ephrines.

## NETRINES, RECEPTORS DCC/UNC I GUIA AXONAL

Les netrines són una família de proteïnes secretables (~600 aa) derivades de la placa del terra que foren identificades com una família quimioatractiva per als axons comissurals, als quals guia cap a la línia mitjana de la medul·la espinal (Sera-

fini *et al.*, 1994, 1996; Kennedy *et al.*, 1994). Estan relacionades amb les laminines, i contenen un domini C-terminal petit de caràcter bàsic, que els confereix la seva propietat de difusió.

S'han descrit diversos membres d'aquesta família, que s'uneixen principalment a DCC (*deleted in colorectal cancer*), a Neogenina, i a UNC 5H-1, -2 i -3. Aquests últims són els receptors que reconeixen les netrines en els mamífers.

Els efectes que són capaces d'exercir les netrines poden ser antagonics depenent dels receptors amb els quals interaccionen. La interacció de la Netrina-1 amb DCC/Neogenina produeix una resposta quimioatractiva, mentre que la unió amb membres de receptors de la família UNC5 provoca quimiorepulsió. Si en la cèl·lula diàna existeix coexpressió d'aquests tipus de receptors, el resultat net serà de repulsió (Cooper, 2002).

A més, aquesta coexpressió i la seva interacció amb la Netrina-1 exerceix un efecte tròfic promotor de la supervivència sobre neurones de la zona ventricular del tronc de l'encèfal (Llambi *et al.*, 2001).

Es coneix que la Netrina-1 és capaç d'atraure axons de projeccions corticals i hipocàmiques, i també neurones precerebel·lars, cèl·lules ganglionars de la retina i interneurons comissurals de la medulla espinal. En canvi, produeix un efecte contrari en actuar sobre axons troclears, neurones motores del nervi cranial o les fibres paral·leles de les cèl·lules granulars del cerebel.

Els ratolins genoanul·lats (*knock-out*) han permès esbrinar els efectes de la pèrdua de funció de la Netrina-1 i també del receptor DCC. Ambdós mostren un fenotip molt semblant, fet que demostra el paper clau de la Netrina-1 a través de la senyalització via DCC. Presenten malformacions severes de l'anatomia del sistema nerviós, sobretot pel que fa als tractes comissurals (encarregats de connectar àrees homòlogues entre els dos hemisferis) de l'hipocamp i del gir dentat, el cos callós i el quiasma òptic, tractes que són absents en el ratolí genoanul·lat (*knock-out*) per la Netrina-1 (Serafini *et al.*, 1996; Braisted *et al.*, 2000; Barallobre *et al.*, 2000) i que comporten la mort de l'individu al cap de poques hores del naixement.

El fenotip que mostra aquest ratolí és força interessant, ja que després del part i durant les poques hores de vida que té, és ben palès el fet que els moviments de les seves extremitats són simultanis ja que no és capaç de moure independentment una meitat del cos de l'altra. Això és un reflex de la pèrdua anatòmica de connexió entre els dos hemisferis mitjançant les fibres comissurals, que hi són absents.

D'altra banda, els ratolins genoanul·lats (*knock-out*) per l'UNC5 presenten una localització ectòpica de les neurones del cerebel deguda a una migració rostral errònia (Ackerman *et al.*, 1997).

A més d'aquests efectes a llarg termini, les netrines secretables posseeixen funcions a curt termini pel que fa al creixement i arborització dendrítica, i estan involucrades en la comunicació neurooligodendroglial (Spassky *et al.*, 2002).

A causa de la naturalesa secretable de la Netrina, és important considerar la seva distribució en l'entorn extracel·lular. Estudis recents han demostrat que aquesta depèn de les propietats d'unió de la Netrina amb altres molècules presents en la matriu extracel·lular i altres molècules de guia axonal (com els Slit) o receptors. El receptor Frazzled (l'ortòleg de DCC en *Drosophila*) és necessari per a la senyal de quimioatracció axonal per mitjà de la Netrina-1, però no per a dur a terme la repulsió axonal. Això condueix a la hipòtesi que el segrest de la Netrina-1 per Frazzled és crucial per a la presentació d'aquest estímul quimioatractiu sobre les cèl·lules diana (Cooper, 2002).

Els mecanismes intracel·lulars de senyalització encara són poc compresos. Però recentment s'ha trobat que l'activació de la MAPK (proteïna cinasa activada en la mitosi) a través de les cinases ERK1 i ERK2 (cinases regulades per senyals extracel·lulars) és crucial (Forcet *et al.*, 2002). A més, els efectes atractius i repulsius exercits per la Netrina depenen de les concentracions citosòliques de cAMP i calci. GTPases com Rac1 i Cdc42 també participen en la senyalització (Li *et al.*, 2002).

La intuïció que forçosament les vies d'atracció-repulsió han de tenir repercussions en el citoesquelet cel·lular queda confirmada pel fet que s'ha trobat una proteïna pont, la NcK-2, que relaciona els receptors de Netrina amb el component d'actina del citoesquelet a través de dominis SH3 presents en la cua citoplasmàtica del receptor DCC.

## SEMAFORINES I ELS SEUS RECEPTORS COM A GUIES DE LA NAVEGACIÓ AXONAL

Les semaforines han estat identificades com a molècules de guia, amb efecte quimiorepel·lent sobre els axons durant el desenvolupament del sistema nerviós. Constitueixen una gran família de proteïnes que conté membres tant secretables com associats a la membrana.

Totes les semaforines comparteixen un domini «Sema» d'uns 500 aminoàcids responsable de la seva especificitat d'unió (Nakamura *et al.*, 2000; Raper, 2000). Aquest domini és necessari i suficient per si sol per a desencadenar la seva activitat biològica.

Les semaforines secretables s'han caracteritzat com a quimiorepel·lents sobre axons de neurones de l'hipocamp i del bulb olfatiu, sobre axons pontocerebel·lars del cervell anterior en l'SNC, i també en axons simpàtics, sensorials i motors de l'SNP.

Tot i això, estudis recents indiquen un efecte dual, ja que també tenen propietats atractives sobre:



- dendrites corticals de la superfície pial, com és el cas de la Sema-3A,
- axons corticals, a través de la Sema-3C,
- axons de les cèl·lules mitrals del bulb olfactiu, a través de la Sema-3B (Bagnard *et al.*, 1998; De Castro *et al.*, 1999).

Pel que fa als receptors, és la classe III de semaforines secretables en mamífers la més estudiada. S'uneix a dos membres de la família de les neuropilines, la Np-1 i la Np-2, (Neufeld *et al.*, 2002). Aquests receptors són proteïnes transmembrana amb un domini intracel·lular d'uns quaranta residus, mancat d'activitat senyalitzadora, i són capaços de formar homodímers i heterodímers. S'ha vist que són unes altres molècules, capaces de formar complexos funcionals en unir-se a les neuropilines, les responsables de la senyalització intracel·lular: les plexines (Raper, 2000).

Les quatre classes de plexines, proteïnes també transmembrana, poden interaccionar tant amb neuropilines com amb semaforines. Per exemple, en el complex receptor Np-1-Plexina A1, la Np-1 conté la zona d'unió a la Sema-3A, mentre que la Plexina-A1 actua com a transductora de senyal. Els receptors per al factor de creixement endotelial vascular (VEGF), molècules d'adhesió cel·lular com la L1, o receptors de neurotrofines són capaços d'unir-se a les neuropilines (i possiblement també a les plexines), i formar complexos receptors multimèrics (Neufeld *et al.*, 2002).

Els efectes descrits per a les semaforines secretables sobre la navegació axonal són quasi exclusivament de tipus repulsiu. En algunes ocasions, aquestes molècules provoquen el col·lapse dels conus de creixement axonal, i fins i tot poden ser responsables de promoure l'apoptosi d'algunes poblacions neuronals (Shirvan *et al.*, 2000). Al contrari, s'ha descrit un efecte tròfic sobre progenitors oligodendroglials (Spassky *et al.*, 2002).

La gran quantitat de molècules que pertanyen a aquesta família de lligands-receptors fa esperar que existeixi cert solapament funcional entre els seus membres. Aquesta idea es reforça en estudiar les anomalies presents en el ratolí genoanul·lat (*knock-out*) per la Sema-3A, que s'uneix exclusivament a la Np-1, i que es limiten a l'absència d'alguns grups de neurones sensorials en l'SNP i a un patró desdibuixat de l'estructura laminar de les connexions de l'hipocamp.

L'abundància de diferents membres junt amb l'especificitat d'algunes parelles té altres conseqüències. És cert que la Sema-3A promou repulsió axonal només en cèl·lules que expressen el receptor Np-1, però aquest és capaç d'unir-se també a la Sema-3B o la Sema-3C, panorama que fa pensar en una unió competitiva al receptor entre diverses semaforines, i que axons que contenen Np-1 podrien travessar àrees no permissives «Sema-3A» si altres semaforines actuessin com a antagonistes (Tamagnone i Comoglio, 2000).

Les vies de senyalització a través de semaforines es coneixen de manera discontinua. Algunes proteïnes implicades són les CRMP (proteïnes mediadores de la

resposta per col·lapsina), cinases com la GSK-3 (cinasa de la glicogen sintasa) (Eickholt *et al.*, 2002) i la PAK (cinasa activada P21) (Aizawa *et al.*, 2001) o membres de la família Rho de GTPases (Negishi i Katoh, 2002)

A més, un estudi recent ha descobert que la MICAL, una proteïna citosòlica localitzada en els axons, amb dominis flavoproteïna monooxigenasa, és capaç d'interaccionar amb les plexines, i que els inhibidors de l'activitat monooxigenasa són capaços de revocar la repulsió axonal per mitjà de la Sema-3A. Cal destacar que els experiments de Terman i els seus col·laboradors, han estat els primers a vincular processos oxidoreductasa amb guia axonal (Terman *et al.*, 2002).

## EL SISTEMA DE GUIA SLIT/ROUNDABOUT

El grup de molècules Slit fou identificat a la medul·la espinal (vegeu la revisió de Kaprielian *et al.*, 2000), i en mamífers, se'n coneixen tres membres, Slit-1, -2 i -3. Contenen un domini N-terminal, ric en leucina, que se sap que és vital per a la seva acció biològica, i que limita la seva acció difusible a llarg rang. El receptors dels Slit s'anomenen *Robo*, i a diferència dels receptors de les semaforines, contenen un gran domini intracitoplasmàtic que els permet desencadenar vies de transducció. En vertebrats es coneixen el Robo-1, el Robo-2 i el Rig-1. Els dos primers mostren una afinitat química similar per a cada Slit, promiscuïtat que produeix redundància molecular.

Els resultats publicats fins ara limiten l'acció de l'Slit/Robo a la repulsió del conus de creixement (Nguyen-Ba-Charvet i Chedotal, 2002). Actuen sobre axons motors i sobre neurones comissurals de la medul·la espinal un cop han travessat la línia mitjana, sobre cèl·lules retinals ganglionars, cèl·lules mitrals del bulb olfatiu, neurones talàmiques que projecten al còrtex, axons corticals que projecten dins del cos callós i neurones que projecten des del gir dentat de l'hipocamp. En alguns d'aquests casos, són capaces de col·lapsar els conus de creixement, de manera similar al que s'ha descrit en les semaforines. També s'ha suggerit en un estudi de McAllister de l'any 2002 que l'Slit-2 pot induir elongació axonal i arborització en neurones del gangli de l'arrel dorsal de mamífers.

En invertebrats, l'Slit-2 és capaç d'interaccionar fortament amb la Netrina-1 (Guthrie, 2001), i també s'uneix a glypican-1 (un proteoglicà d'heparan sulfat). Recentment s'ha demostrat que per a exercir una repulsió potent, el complex Slit-2/Robo-1 ha d'interaccionar amb molècules d'heparan sulfat de la superfície cel·lular.

Els Robo també poden interaccionar amb DCC (receptor de Netrina-1) i CXCR4 (un receptor de quimioquines) (Cooper, 2002), fent intrincada la xarxa de transducció de les molècules de guia axonal, i demostrant que existeix una interconnexió forta entre aquestes vies.

A més, els patrons d'expressió dels slit i dels robo, que són complementaris o solapats en moltes estructures de l'SNC, apunten que aquestes molècules poden actuar de manera autocrina, és a dir, que una cèl·lula secreta una molècula vers la qual és sensible.

## EL SISTEMA DE GUIA EPHRINA / RECEPTORS EPH

Les ephrines són un grup de molècules ancorades a la membrana que s'uneixen a membres de receptors Eph tirosina-cinasa. L'activació dels receptors Eph per interacció amb els lligands Ephrina causa la seva homodimerització i autofosforil·lació.

Hi ha dos tipus de lligands Ephrina, en funció del tipus d'associació que mantenen amb la membrana plasmàtica. El tipus A conté un grup GPI (glucosilfosfatidilinositol), mentre que el tipus B està format per proteïnes transmembrana amb un petit domini citoplasmàtic (Gale *et al.*, 1996). Fins a l'actualitat, s'han descrit en els vertebrats cinc lligands Ephrina-A, tres de tipus Ephrina-B i fins a catorze receptors Eph, categoritzats en EphA i EphB, obeint al fet que, tot i existir certa promiscuïtat, les ephrines A i B s'uneixen principalment als receptors EphA i EphB respectivament, amb l'excepció de l'EphB4, que reté els lligands Ephrina-A i Ephrina-B equivalentment.

Les ephrines estan involucrades en diferents processos que transcorren en el desenvolupament de l'SNC (Wilkinson, 2001): determinació de la identitat regional durant la regionalització del tub neural, guia de cèl·lules migratòries, formació de tractes axonals i mapes topogràfics, arborització axonal, etc.

Ephrines i receptors Eph han estat catalogats com a molècules repulsives per als axons en creixement, acció dependent del contacte entre membranes, a causa del seu caràcter no difusible. Tot i això, es coneix l'efecte dual d'aquestes molècules; per exemple, impedeixen als tractes corticoespinals creuar la línia mitjana de la medulla espinal (Imondi *et al.*, 2000), mentre que canalitzen els axons comissurals per tal de travessar-la en el cervell mitjà i anterior (Orioli *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997).

De manera anàloga, promouen l'arborització d'axons hipocàmics a través de l'Ephrina-A5 i l'Ephrina-A2 (Gao *et al.*, 1999; Man *et al.*, 2002), mentre que d'altres són supressores sobre les cèl·lules ganglionars de la retina (Roskies *et al.*, 1994).

Aquestes molècules són vitals a l'hora de generar mapes topogràfics de projecció. L'exemple clàssic és el desenvolupament de la projecció des de la retina fins al tèctum; axons emesos per les cèl·lules ganglionars de la retina temporal projecten a la part anterior del tèctum, mentre que els axons que provenen de la retina nasal ho fan a la part posterior (Cheng *et al.*, 1995; Drescher *et al.*, 1995). Aquesta segregació té una correspondència amb els patrons d'expressió dels lligands i els receptors: les molècules Ephrina-A2 i Ephrina-A5 s'expressen en el tèctum en un gradient creixent en sentit anteroposterior, mentre que l'EphA3 (en pollastre) o l'EphA5 (en

ratolí) són presents en nivells més alts en els axons de les neurones de la retina temporal que en els de les neurones de la retina nasal. D'aquesta manera, els axons més sensibles a les ephrines (axons temporals) s'aturen en la meitat anterior del tèctum, i els menys sensibles (axons nasals) són capaços de viatjar fins a la meitat posterior. Diversos estudis, utilitzant mutants genoanul·lats (*knock-out*) per l'Ephrina-A2 i/o l'Ephrina-A5 o bé provocant l'expressió ectòpica de l'EphA3 en algunes cèl·lules de la retina, corroboren aquesta important funció de l'Ephrina/Eph en l'establiment d'aquest mapa topogràfic (Frisén *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2000; Feldheim *et al.*, 2000).

Altres mapes topogràfics que interconnecten diverses àrees també són especificats per aquestes molècules: retina - nucli geniculat lateral, òrgan vomeronasal - bulb olfactiu, hipocamp-septe del cervell anterior o neurones motores de la medul·la espinal - músculs (Knöll i Drescher, 2000).

En un estudi recent (Thompson, 2003) s'ha demostrat que l'activació dels receptors EphB causa la transformació de filopodis en espines dendrítiques, i a més, el reclutament de receptors NMDA, necessaris per a l'establiment de sinapsis excitatòries funcionals. A més, Murai i els seus col·laboradors, realitzant experiments de modificació d'activació dels receptors EphA, han demostrat que aquests són importants en la morfològia de les espines dendrítiques de les cèl·lules piramidals de l'hipocamp en l'adult, i més concretament, en la senyalització entre astròcits i neurones, ja que els astròcits que envolten les sinapsis expressen l'Ephrina-A3 (Murai *et al.*, 2003).

Pel que fa a la senyalització intracel·lular, se sap que l'activació dels receptors EphA transforma l'estat de les integrines, inactivant-les a través de la FAK (una cinasa d'adhesió focal involucrada en la via de senyalització via integrina), i produint un estat de desadhesió com a preludi de la repulsió (Miao *et al.*, 2001). Tanmateix, una ruta alternativa pot promoure l'adhesió cel·lular i l'atracció axonal a través de la  $\beta$ 1-integrina i la cinasa Src (Davy i Robbins, 2000; Huai i Drescher, 2001).

També es coneixen efectes oposats sobre la cascada de les MAP (proteïna associada a microtúbuls) a través de l'EphA o Ephrina-A. L'activació del receptor inactiva l'ERK1 i l'ERK2 (cinases regulades per senyals extracel·lulars), fet que deriva en la inactivació de les cadenes lleugeres de la miosina, i promou desadhesió, mentre que els lligands Ephrina-A activen la miosina i produeixen adhesió i creixement (Davy i Robbins, 2000).

## EL PAPER DE LES MOLÈCULES DE GUIA EN LA REGENERACIÓ NEURAL

Al contrari dels axons de l'SNP, els de l'SNC són incapaços de regenerar-se espontàniament després d'una lesió. Les lesions en l'SNC van seguides d'una sèrie d'alteracions histològiques persistents tals com la mort cel·lular, la degeneració de

les fibres nervioses seccionades, la infiltració i la proliferació de cèl·lules no neuronals (cèl·lules meníngies i fibroblasts) i la deposició de components de la matriu extracel·lular a la zona de lesió (Fawcett i Asher, 1999). Tot i les respostes d'arborització local dels axons lesionats, aquests són incapaços de recreixer i per tant és impossible la reconexió amb la seva diana sinàptica. Les poblacions reactives glials i meníngies proliferen i formen una barrera no permissiva en la zona de lesió que inhibeix fortament el recreixement axonal. Aquest medi no permissiu es coneix com a *cicatriu glial*, i conté un combinat de molècules inhibidores com Nogo i MAG (glicoproteïna associada a la mielina), i altres proteïnes de matriu, com els proteoglicans sulfatats i el col·lagen (Horner i Gage, 2000).

Estudis actuals demostren que en lesions d'axotomia de tipus tallant en el cervell anterior i en la medul·la espinal, es reexpressen diverses semaforines per part de cèl·lules de les meninges que s'infiltra en el parènquima nerviós (Pasterkamp i Verhaagen, 2001). En canvi, en lesions contusives, l'expressió de semaforines està limitada a la fulla meníngia. En contrast amb el que succeeix quan es produeix una lesió en l'SNC, la lesió en l'SNP no induïx l'expressió de la SEMA3A, ans el contrari: les motoneurons disminueixen l'expressió de la Sema-3A, fet que coincideix amb l'episodi del recreixement axonal (Pasterkamp *et al.*, 1998).

Miranda i els seus col·laboradors han demostrat la sobreexpressió d'altres molècules de guia axonal en la cicatriu glial (Miranda *et al.*, 1999). L'EphB3 és expressada pels astròcits reactius en lesions de medul·la de tipus contusiu, però no en canvi en altres models de lesió, com la secció del nervi òptic. Cadascuna de les diferents lesions en l'SNC és única en l'aspecte de la resposta cel·lular i molecular, i aquestes molècules inhibidores del creixement hi tenen rols diferents.

Les netrines i els seus receptors també es regulen en cas de lesió; existeix un augment de fins a un factor 40 en l'expressió de la Netrina-1 en les cèl·lules de Schwann després d'una lesió de l'SNP (Madison *et al.*, 2000). Els receptors DCC i UNC5 mostren un decrement de l'expressió en cèl·lules ganglionars de la retina després de la secció del nervi òptic, i també en axons regenerants olfactivs després d'una bulbectomia unilateral (Astic *et al.*, 2002).

Aquestes dades posen de manifest la necessitat i l'encert d'estudiar aquestes molècules de guia axonal en el panorama de la regeneració de l'SNC.

## LA SINERGIA DE LES MOLÈCULES DE GUIA AXONAL PER AL DESENVOLUPAMENT DE CONNEXIONS HIPOCÀMPIQUES

L'hipocamp i la *fascia dentata* són àrees corticals discretes amb un patró únic d'organització laminar de capes cel·lulars i aferències nervioses. Els cossos cel·lulars de les neurones principals (cèl·lules piramidals i granulars) s'agrupen en dues fulles

cel·lulars, que reben les principals connexions nervioses (aferència de l'escorça entorínica i projeccions del septo i comissurals) a diferents nivells de la longitud de les seves dendrites, en una forma estratificada (Amaral i Witter, 1995). Aquesta estructura planteja la qüestió de com aquestes connexions tan acurades s'estableixen i especifiquen durant el desenvolupament.

Els estudis de desenvolupament *in vitro* han posat en evidència que els axons entorínics i els comissurals són repel·lits per les semaforines secretables (Sema-3A i Sema-3F) (Chedotal *et al.*, 1998; Steup *et al.*, 1999; Pozas *et al.*, 2001). A més, la Netrina-1 atrau els axons comissurals de l'hipocamp en cultius de col·lagen (Barallobre *et al.*, 2000; Steup *et al.*, 2000; Skutella i Nitsch, 2001).

Pel que fa als estudis d'expressió, els assajos d'hibridació *in situ* mostren que les semaforines i els seus receptors s'expressen en l'escorça entorínica i en l'hipocamp. El receptor de la Netrina-1 (DCC) també s'expressa en neurones hipocàmiques, i l'mRNA de la Netrina-1 es pot trobar en el ventricle pròxim a la fimbria. Aquestes dades suggereixen que els axons entorínics són repel·lits per les semaforines presents en l'escorça, i dirigits cap a l'hipocamp. La combinació dels dos senyals seria, doncs, capaç de dirigir els axons comissurals de l'hipocamp cap a la fimbria, repel·lits per les semaforines i atrets per la Netrina-1.

Un altre membre de la família de les semaforines, la Sema-3C, és capaç de promoure repulsió sobre neurites septals, però no sobre les que tenen un origen entorínic o hipocàmpic. D'aquesta manera es regula l'entrada d'aferents septohipocàmics (Steup *et al.*, 2000). A més, l'Ephrina-A3 i el seu receptor, l'EphA5, també modelen les fibres entoríniques en un mode d'especificació sinàptica laminar (Stein *et al.*, 1999). Un estudi recent ha posat de relleu que el sistema Ephrina/Eph també regula la connexió septohipocàmpica (Yue *et al.*, 2002); lligands i receptors s'expressen en territoris oposats en l'hipocamp i en el septo lateral, i l'expressió ectòpica de receptors truncats Eph altera el mapa topogràfic d'aquesta connexió.

El desenvolupament també requereix l'acció de la via de l'Slit/Robo per a configurar l'hipocamp; l'Slit-1 i l'Slit-2 s'expressen en l'escorça entorínica, mentre que els seus receptors s'expressen en el gir dentat (Nguyen Ba-Charvet *et al.*, 1999). La funció putativa de l'Slit/Robo seria, doncs, preservar l'organització intrínseca laminar de les connexions hipocàmiques.

El conjunt d'aquestes dades demostra que un gran nombre de molècules junt amb els seus receptors tenen un paper actiu a l'hora de promoure el creixement i la guia de les connexions hipocàmiques. Les accions coordinades i la sinergia existent entre aquestes molècules i altres com les neurotrofines o molècules d'adhesió cel·lular modulen les propietats atractives/quimiorrepulsives d'aquests axons.

## BIBLIOGRAFIA

- ACKERMAN, S. L.; KOZAK, L. P.; PRZYBORSKI, S. A.; RUND, L. A.; BOYER, B. B.; KNOWLES, B. B. (1997). «The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein». *Nature*, núm. 386, p. 838-842.
- AIZAWA, H.; WAKATSUKI, S.; ISHII, A.; MORIYAMA, K.; SASAKI, Y.; OHASHI, K.; SEKINE-AIZAWA, Y.; SEHARA-FUJISAWA, A.; MIZUNO, K.; GOSHIMA, Y.; YAHARA, I. (2001). «Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse». *Nat. Neurosci.*, núm. 4, p. 367-373.
- AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. (1995). *The hippocampal formation*. Nova York: Academic Press.
- ASTIC, L.; PELLIER-MONNIN, V.; SAUCIER, D.; CHARRIER, C.; MEHLEN, P. (2001). «Expression of netrin-1 and netrin-1 receptor, DCC, in the rat olfactory nerve pathway during development and axonal regeneration». *Neuroscience*, núm. 109, p. 643-656.
- BAGNARD, D.; LOHRUM, M.; UZIEL, D.; PUSCHEL, A. W.; BOLZ, J. (1998). «Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections». *Development*, núm. 125, p. 5043-5053.
- BARALLOBRE, M. J.; RÍO, J. A. del; ALCANTARA, S.; BORRELL, V.; AGUADO, F., RUIZ, M.; CARMONA, M. A.; MARTIN, M.; FABRE, M.; YUSTE, R.; TESSIER-LAVIGNE, M.; SORIANO, E. (2000). «Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice». *Development*, núm. 127, p. 4797-4810.
- BEHAR, O.; GOLDEN, J. A.; MASHIMO, H.; SCHOEN, F. J.; FISHMAN, M. C. (1996). «Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart». *Nature*, núm. 383, p. 525-528.
- BRAISTED, J. E.; CATALANO, S. M.; STIMAC, R.; KENNEDY, T. E.; TESSIER-LAVIGNE, M.; SHATZ, C. J.; O'LEARY, D. D. M. (2000). «Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection». *J. Neurosci.*, núm. 20, p. 5792-5801.
- BROWN, A.; YATES, P. A.; BURROLA, P.; ORTUNO, D.; VAIDYA, A.; JESSELL, T. M.; PFAFF, S. L.; O'LEARY, D. D.; LEMKE, G. (2000). «Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling». *Cell*, núm. 102, p. 77-88.
- CASTELLANI, V.; YUE, Y.; GAO, P. P.; ZHOU, R.; BOLZ, J. (1998). «Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits». *J. Neurosci.*, núm. 18, p. 4663-4672.
- CASTRO, F. de; HU, L.; DRABKIN, H.; SOTELO, C.; CHEDOTAL, A. (1999). «Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins». *J. Neurosci.*, vol. 11, núm. 19 (1 juny), p. 4428-4436.
- CHEDOTAL, A.; RÍO, J. A. del; RUIZ, M.; HE, Z.; BORRELL, V.; CASTRO, F. de; EZAN, F.; GOODMAN, C. S.; TESSIER-LAVIGNE, M.; SOTELO, C.; SORIANO, E. (1988). «Semaphorins III and IV repel hippocampal formation via two distinct receptors». *Development*, núm. 125, p. 4313-4323.
- CHENG, H. J.; NAKAMOTO, M.; BERGEMANN, A. D.; FLANAGAN, J. G. (1995). «Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map». *Cell*, núm. 82, p. 371-381.

- COOPER, H. M. (2002). «Axon guidance receptors direct growth cone pathfinding: rivalry at the leading edge». *Int. J. Dev. Biol.*, núm. 46, p. 621-631.
- COWAN, C. A.; HENKEMEYER, M. (2002). «Ephrins in reverse, park and drive». *Trends Cell Biol.*, núm. 12, p. 339-346.
- DAVY, A.; ROBBINS, S. M. (2000). «Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner». *EMBO J.*, núm. 19, p. 5396-5405.
- DE WINTER, F.; OUDEGA, M.; LANKHORST, A. J.; HAMERS, F. P.; BLITS, B.; RUITENBERG, M. J.; PASTERKAMP, R. J.; GISPEN, W. H.; VERHAAGEN, J. (2002). «Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord». *Exp. Neurol.*, núm. 175, p. 61-75.
- DRESCHER, U.; KREMOSER, C.; HANDWERKER, C.; LOSCHINGER, J.; NODA, M.; BONHOEFER, F. (1995). «In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases». *Cell*, núm. 82, p. 359-370.
- EICKHOLT, B. J.; WALSH, F. S.; DOHERTY, P. (2002). «An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling». *J. Cell Biol.*, núm. 157, p. 211-217.
- ELLEZAM, B.; SELLES-NAVARRO, I.; MANITT, C.; KENNEDY, T. E.; MCKERRACHER, L. (2001). «Expression of netrin-1 and its receptors DCC and UNC-5H2 after axotomy and during regeneration of adult rat retinal ganglion cells». *Exp. Neurol.*, núm. 168, p. 105-115.
- FAWCETT, J. W.; ASHER, R. A. (1999). «The glial scar and central nervous system repair». *Brain Res. Bull.*, núm. 49, p. 377-391.
- FELDHEIM, D. A.; KIM, Y. I.; BERGEMANN, A. D.; FRISÉN, J.; BARBACID M.; FLANAGAN, J. G. (2000). «Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping». *Neuron*, núm. 25, p. 563-574.
- FORCET, C.; STEIN, E.; PAYS, L.; CORSET, V.; LLAMBI, F.; TESSIER-LAVIGNE, M.; MEHLEN, P. (2002). «Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation». *Nature*, núm. 417, p. 443-447.
- FRISÉN, J.; YATES, P. A.; MCLAUGHLIN, T.; FRIEDMAN, G. C.; O'LEARY, D. D.; BARBACID, M. (1998). «Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system». *Neuron*, núm. 20, p. 235-243.
- GALE, N.; HOLLAND, S.; VALENZUELA, D.; FLENNIKEN, A.; PAN, L.; RYAN, T.; HENKEMEYER, M.; STREBHARDT, K.; HIRAI, H.; WILKINSON, D.; PAWSON, T.; DAVIS, S.; YANCOPOULUS, G. (1996). «Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis». *Neuron*, núm. 17, p. 9-19.
- GAO, P. P.; YUE, Y.; CERRETTI, D. P.; DREYFUS, C.; ZHOU, R. (1999). «Ephrin-dependent growth and pruning of hippocampal axons». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 96, p. 4073-4077.
- GHOSE, A.; VACTOR, D. van (2002). «GAPs in Slit- robo signaling». *Bioessays*, núm. 24, p. 401-404.
- GIGER, R. J.; KOLODKIN, A. L. (2001). «Silencing the siren: guidance cue hierarchies at the CNS midline». *Cell*, núm. 105, p. 1-4.
- GUTHRIE, S. (2001). «Axon guidance: robos make the rules». *Curr. Biol.*, núm. 11, p. 300-303.



- HATTORI, M.; OSTERFIELD, M.; FLANAGAN, J. G. (2000). «Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent». *Science*, núm. 289, p. 1360-1365.
- HORNER, P. J.; GAGE, F. H. (2000). «Regenerating the damaged central nervous system». *Nature*, núm. 407, p. 963-970.
- HUAL, J.; DRESCHER, U. (2001). «An ephrin-A-dependent signalling pathway controls integrin function and is linked to the tyrosine phosphorylation of a 120 kDa protein». *J. Biol. Chem.*, núm. 276, p. 6689-6694.
- IMONDI, R.; WIDEMAN, C.; KAPRIELIAN, Z. (2000). «Complementary expression of transmembrane ephrins and their receptors in the mouse spinal cord: a possible role in constraining the orientation of longitudinally projecting axons». *Development*, núm. 127, p. 1397-1410.
- KAPRIELIAN, Z.; IMONDI, R.; RUNKO, E. (2000). «Axon guidance at the midline of the developing CNS». *Anat. Rec.*, núm. 261, p. 176-197.
- KENNEDY, T. E.; SERAFINI, T.; TORRE, J. R. de la; TESSIER-LAVIGNE, M. (1994). «Netrins are diffusible chemotrophic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord». *Cell*, núm. 78, p. 425-435.
- KNÖLL, B., DRESCHER, U. (2002). «Ephrin-As as receptors in topographic projections». *Trends Neurosci.*, núm. 25, p. 145-149.
- KNÖLL, B.; ISENMANN, S.; KILIC, E.; WALKENHORST, J.; ENGEL, S.; WEHINGER, J.; BAHR, M.; DRESCHER, U. (2001). «Graded expression patterns of ephrin-As in the superior colliculus after lesion of the adult mouse optic nerve». *Mech. Dev.*, vol. 1-2, núm. 106 (agost), p. 119-127.
- LI, X.; MERIANE, M.; TRIKI, I.; SHEKARABI, M.; KENNEDY, T. E.; LAROSE, L.; LAMARCHE-VANE, N. (2002). «The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism». *J. Biol. Chem.*, núm. 277, p. 37788-37797.
- LI, X.; SAINT-CYR-PROULX, E.; AKTORIES, K.; LAMARCHE-VANE, N. (2002). «Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 277, p. 15207-15214.
- LIVESEY, F. J. (1999). «Netrins and netrin receptors». *Cell. Mol. Life Sci.*, núm. 56, p. 62-68.
- LLAMBI, F.; CAUSERET, F.; BLOCH-GALLEGO, E.; MEHLEN, P. (2001). «Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC». *EMBO J.*, núm. 20, p. 2715-2722.
- LLINÁS, Rodolfo R. (2003). «The contribution of Santiago Ramón y Cajal to functional neuroscience». *Nature Reviews*, vol. 4.
- MADISON, R. D.; ZOMORODI, A.; ROBINSON, G. A. (2000). «Netrin-1 and peripheral nerve regeneration in the adult rat». *Exp. Neurol.*, núm. 161, p. 563-570.
- MANN, F.; PEUCKERT, C.; DEHNER, F.; ZHOU, R.; BOLZ, J. (2002). «Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections». *Development*, núm. 129, p. 3945-3955.
- MCALLISTER, A. K. (2002). «Conserved cues for axon and dendrite growth in the developing cortex». *Neuron*, núm. 33, p. 2-4.
- MIAO, H.; WEI, B. R.; PEEHL, D. M.; LI, Q.; ALEXANDROU, T.; SCHELLING, J. R.; RHIM, J. S.;

- SEADOR, J. R.; BURNETT, E.; WANG, B. (2001). «Activation of Eph receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway». *Nat. Cell. Biol.*, núm. 3, p. 527-530.
- MING, G. L.; WONG, S. T.; HENLEY, J.; YUAN, X. B.; SONG, H. J.; SPITZER, N. C.; POO, M. (2002). «Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones». *Nature*, núm. 417, p. 411-418.
- MIRANDA, J. D.; WHITE, L. A.; MARCILLO, A. E.; WILLSON, C. A.; JAGID, J.; WHITTEMORE, S. R. (1999). «Induction of Eph B3 after spinal cord injury». *Exp. Neurol.*, núm. 156, p. 218-222.
- MITSUI, N.; INATOME, R.; TAKAHASHI, S.; GOSHIMA, Y.; YAMAMURA, H.; YANAGI, S. (2002). «Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling». *EMBO J.*, núm. 21, p. 3274-3285.
- MURAI, K. K.; NGUYN, L. N.; IRIE, F.; YAMAGUCHI, Y.; PASQUALE, E. B. (2003). *Nature Neuroscience*, núm. 6, p. 153-160.
- NAKAMURA F.; KALB, R. G.; STRITTMATTER, S. M. (2000). «Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance». *J. Neurobiol.*, núm. 44, p. 219-229.
- NEGISHI, M.; KATOH, H. (2002). «Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation». *Journal Biochem.*, núm. 132, p. 157-166.
- NEUFELD, G.; COHEN, T.; SHRAGA, N.; LANGE, T.; KESSLER, O.; HERZOG, Y. (2002). «The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis». *Trends Cardiovasc. Med.*, núm. 12, p. 13-19.
- NGUYEN BA-CHARVET, K. T.; BROSE, K.; MARILLAT, V.; KIDD, T.; GOODMAN, C. S.; TESSIER-LAVIGNE, M.; SOTELO, C.; CHEDOTAL, A. (1999). «Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons». *Neuron*, núm. 22, p. 463-473.
- NGUYEN-BA-CHARVET, K. T.; CHEDOTAL, A. (2002). «Role of Slit proteins in the vertebrate brain». *J. Physiol.* [Paris], núm. 96, p. 91-98.
- ORIOLO, D.; HENKEMEYER, M.; LEMKE, G.; KLEIN, R.; PAWSON, T. (1996). «Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation». *EMBO J.*, núm. 15, p. 6035-6049.
- PARK, S.; FRISÉN, J.; BARBACID, M. (1997). «Aberrant axonal projections in mice lacking EphA8 (Eek) tyrosine protein kinase receptors». *EMBO J.*, núm. 16, p. 3106-3114.
- PASTERKAMP, R. J.; GIGER, R. J.; VERHAAGEN, J. (1998). «Regulation of semaphorin III/collapsin-1 gene expression during peripheral nerve regeneration». *Exp. Neurol.*, núm. 153, p. 313-327.
- PASTERKAMP, R. J.; VERHAAGEN, J. (2001). «Emerging roles for semaphorins in neural regeneration». *Brain Res. Rev.*, núm. 35, p. 36-54.
- PETRAUSCH, B.; JUNG, M.; LEPPERT, C. A.; STUERMER, C. A. (2000). «Lesion-induced regulation of netrin receptors and modification of netrin-1 expression in the retina of fish and grafted rats». *Mol. Cell. Neurosci.*, núm. 16, p. 350-364.
- POZAS, E.; PASCUAL, M.; NGUYEN, BA-CHARVET, K. T.; GUÑIJARRO, P.; SOTELO, C.; CHEDOTAL, A.; RÍO, J. A. del; SORIANO, E. (2001). «Age-dependent effects of secreted Semaphorins 3A, 3F, and 3E on developing hippocampal axons: in vitro effects and phenotype of Semaphorin 3A (-/-) mice». *Mol. Cell. Neurosci.*, núm. 18, p. 26-43.
- RAPER, J. A. (2000). «Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates». *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 1, núm. 10 (febrer), p. 88-94.

- ROSKIES, A. L.; O'LEARY, D. D. M. (1994). «Control of topographic retinal axon branching by inhibitory membrane-bound molecules». *Science*, núm. 265, p. 799-803.
- SERAFINI, T.; COLAMARINO, S. A.; LEONARDO, E. D.; WANG, H.; BEDDINGTON, R.; SKARNES, W. C.; TESSIER-LAVIGNE, M. (1996). «Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system». *Cell*, núm. 87, p. 1001-1014.
- SERAFINI, T.; KENNEDY, T. E.; GALKO, M. J.; MIRZAYAN, C.; JESSELL, T. M.; TESSIER-LAVIGNE, M. (1994). «The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6». *Cell*, núm. 78, p. 409-424.
- SHIFMAN, M. I.; SELZER, M. E. (2000). «Expression of the netrin receptor UNC-5 in lamprey brain: modulation by spinal cord transection». *Neurorehabil. Neural Repair*, núm. 14, p. 49-58.
- SHIRVAN, A.; SHINA, R.; ZIV, I.; MELAMED, E.; BARZILAI, A. (2000). «Induction of neuronal apoptosis by Semaphorin3A-derived peptide». *Brain Res. Mol. Brain Res.*, núm. 83, p. 81-93.
- SKUTELLA, T.; NITSCH, R. (2001). «New molecules for hippocampal development». *Trends Neurosci.*, núm. 24, p. 107-113.
- SOTELO, C. (2003). «Viewing the brain through the master hand of Ramón y Cajal». *Nature Reviews*, vol. 4.
- SPASSKY, N.; CASTRO, F. de; LE BRAS, B.; HEYDON, K.; QUERAUD-LESAUX, F.; BLOCH-GALLEGO, E.; CHEDOTAL, A.; ZALC, B.; THOMAS, J. L. (2002). «Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1». *J. Neurosci.*, vol. 14, núm. 22, p. 5992-6004.
- STEIN, E.; SAVASKAN, N. E.; NINNEMANN, O.; NITSCH, R.; ZHOU, R.; SKUTELLA, T. (1999). «A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting». *J. Neurosci.*, núm. 19, p. 8885-8893.
- STEUP, A.; LOHRUM, M.; HAMSCHO, N.; SAVASKAN, N. E.; NINNEMANN, O.; NITSCH, R.; FUJISAWA, H.; PUSCHEL, A. W.; SKUTELLA, T. (2000). «Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation». *Mol. Cell. Neurosci.*, núm. 15, p. 141-155.
- STEUP, A.; NINNEMANN, O.; SAVASKAN, N. E.; NITSCH, R.; PUSCHEL, A. W.; SKUTELLA, T. (1999). «Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons». *Eur. J. Neurosci.*, núm. 11, p. 729-734.
- TAMAGNONE, L.; COMOGLIO, P. M. (2000). «Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond». *Trends Cell Biol.*, núm. 10, p. 377-383.
- TERMAN, J. R.; MAO, T.; PASTERKAMP, R. J.; YU, H. H.; KOLODKIN, A. L. (2002). «MICALS, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion». *Cell*, núm. 109, p. 887-900.
- TESSIER-LAVIGNE, M.; GOODMAN, C. S. (1996). «The molecular biology of axon guidance». *Science*, núm. 274, p. 1123-1133.
- THOMPSON, Scott M. (2003). «Ephrins keep dendritic spines in shape». *Nature Neuroscience*, vol. 6, núm. 2.
- WALSH, F. S.; DOHERTY, P. (1997). «Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in axon growth and guidance». *Annu. Rev. Cell Biol.*, núm. 13, p. 425-456.

- WILKINSON, D. G. (2001). «Multiple roles of Eph receptors and ephrins in neural development». *Nature Rev. Neurosci.*, núm. 2, p. 155-164.
- WINBERG, M. L.; TAMAGNONE, L.; BAI, J.; COMOGLIO, P. M.; MONTELL, D.; GOODMAN, C. S. (2001). «The transmembrane protein Off-track associates with Plexins and functions downstream of Semaphorin signaling during axon guidance». *Neuron*, núm. 32, p. 53-62.
- YU, T. W.; BARGMANN, C. I. (2001). «Dynamic regulation of axon guidance». *Nat. Neurosci.*, núm. 4, p. 1169-1176.
- YUE, Y.; CHEN, Z. Y.; GALE, N. W.; BLAIR-FLYNN, J.; HU, T. J.; YUE, X.; COOPER, M.; CROCKETT, D. P.; YANCOPOULOS, G. D.; TESSAROLLO, L.; ZHOU, R. (2002). «Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 99, p. 10777-10782.
- ZISCH, A. H.; STALLCUP, W. B.; CHONG, L. D.; DAHLIN-HUPPE, K.; VOSHOL, J.; SCHACHNER, M.; PASQUALE, E. B. (1997). «Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cek5». *J. Neurosci. Res.*, núm. 47, p. 655-665.

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  $Ca^{2+}$  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 medul·la 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 mancança 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 induïx 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.; HOUENOU, 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.

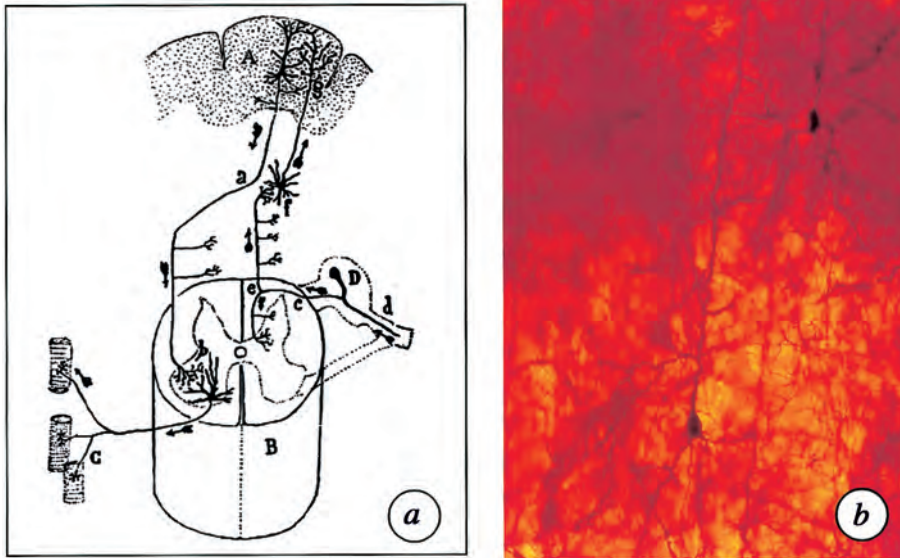


FIGURA 1. *a)* Esquema segons Ramón y Cajal de la «marcha de las incitaciones motrices voluntarias y de las sensitivas conscientes» en el qual s'assenyala clarament la primera neurona a l'escorça cerebral (A) que empalma amb la segona neurona a la banya anterior de la medul·la espinal (B), la qual acaba 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.

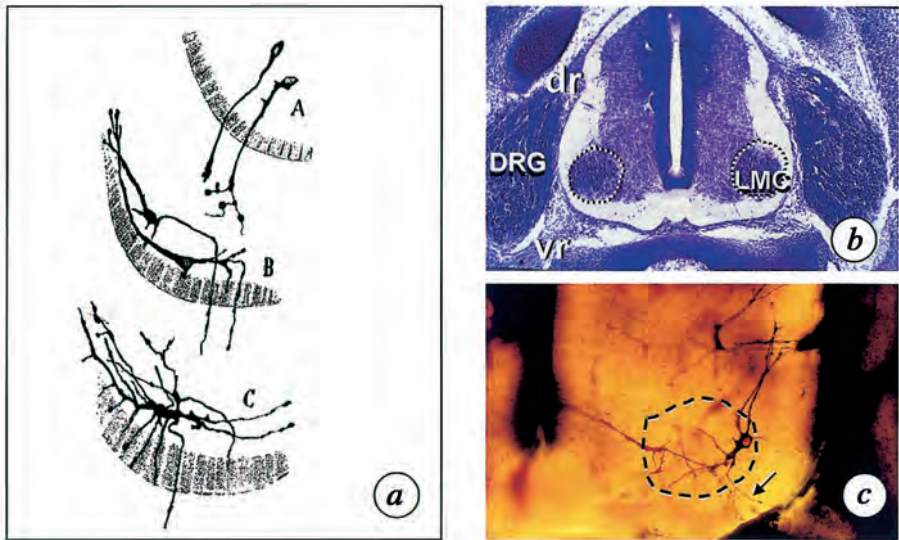
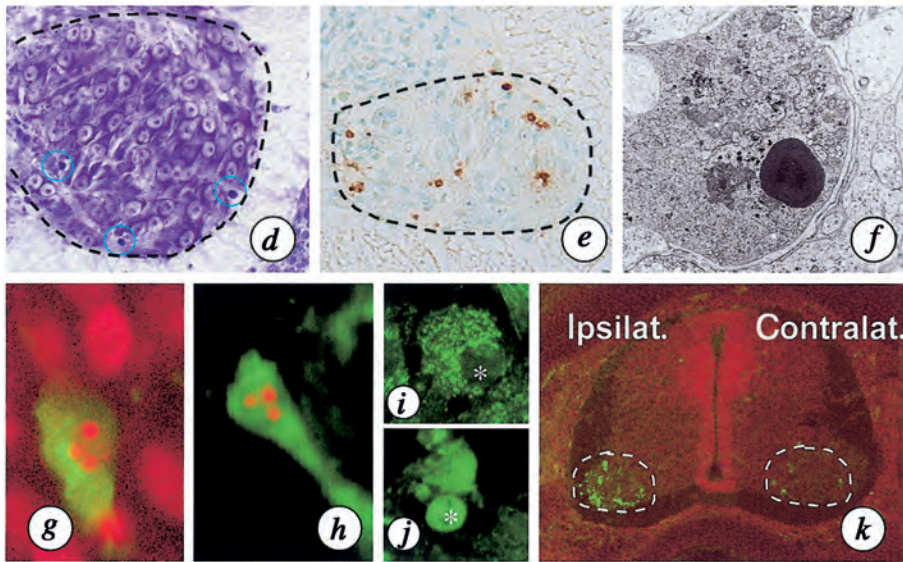


FIGURA 2. *a*) Dibuix realitzat per Santiago Ramón y Cajal que representa el desenvolupament d'una neurona motora en la medul·la espinal de l'embrió de pollastre de tres, quatre i cinc dies d'incubació. Aquestes neurones es formen en etapes molt primerenques i ben aviat adquireixen una bona diferenciació 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 raquídi (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.

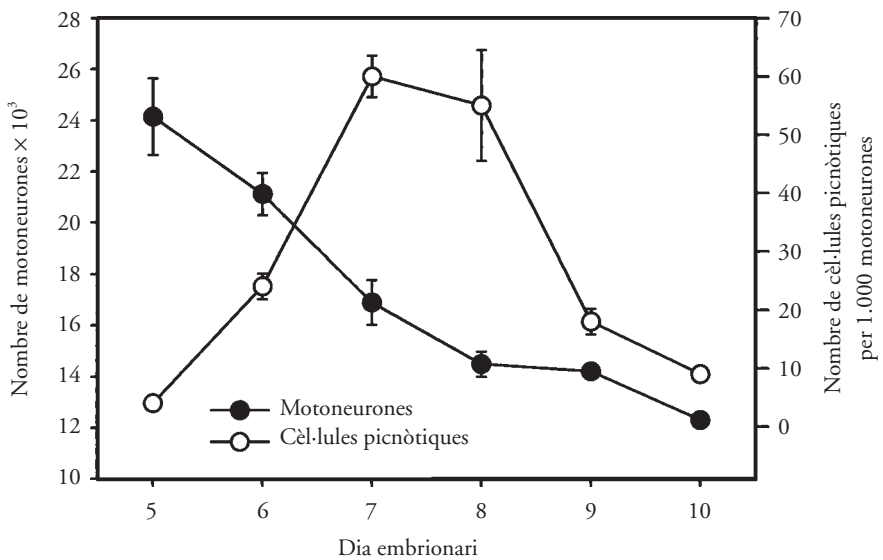


FIGURA 3. Perfil del nombre total de MN en la columna motora lateral lumbar durant el desenvolupament de l'embrió de pollastre. Hom pot observar el descens gradual del nombre de MN entre l'E5 i l'E10 degut a l'eliminació natural d'una part d'aquestes MN per mort cel·lular programada. També s'ha quantificat 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).



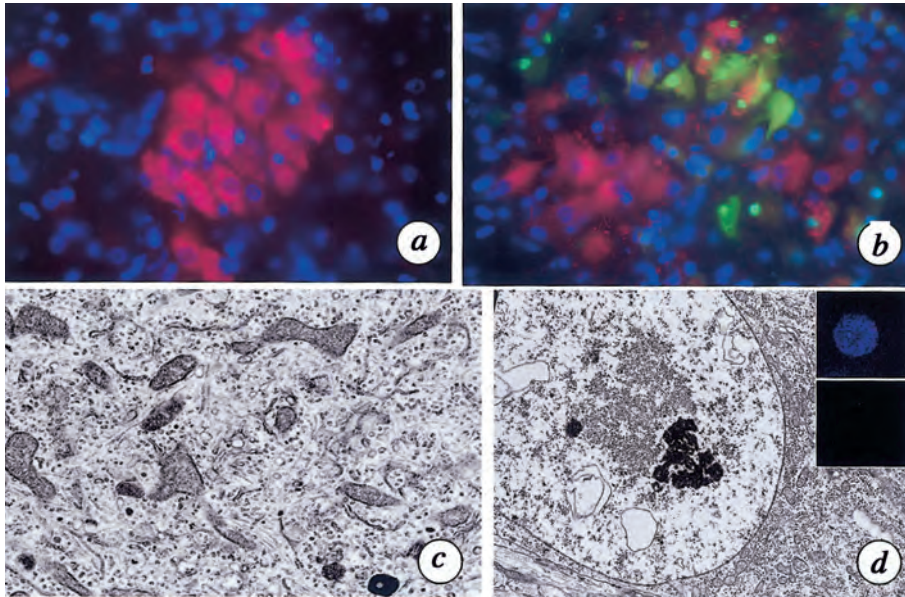
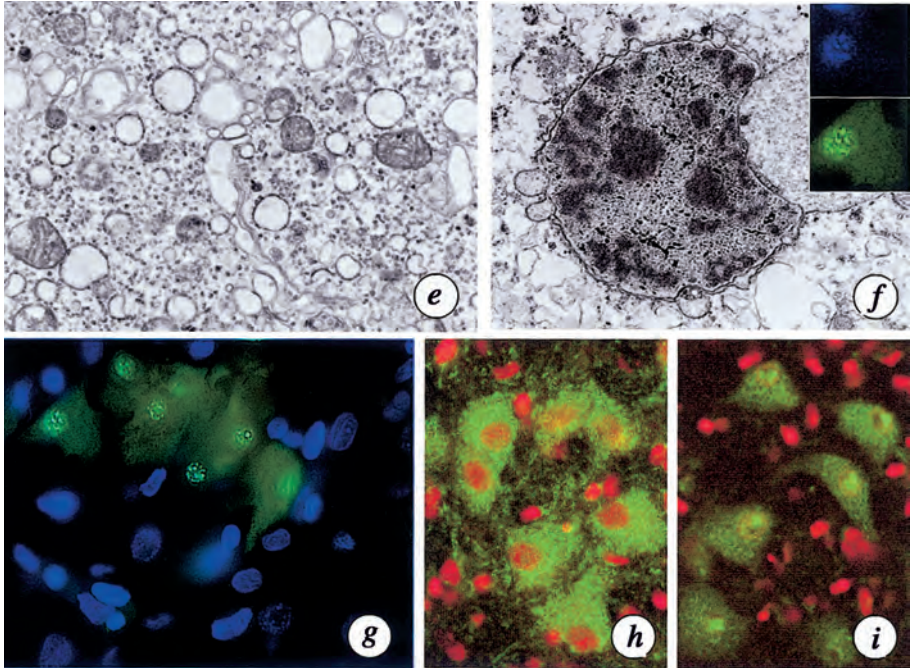


FIGURA 4. *a) i b)* Grup de MN d'un embrió de pollastre E10 sis hores després de l'administració *in ovo* de 0,1 mg de kaïnata (*a*) o bé de 0,1 mg de NMDA (*b*). S'ha fet un marcatge múltiple fluorescent per a posar en evidència el DNA total (blau), el DNA fragmentat (TUNEL, verd) i el neuropèptid propi 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.

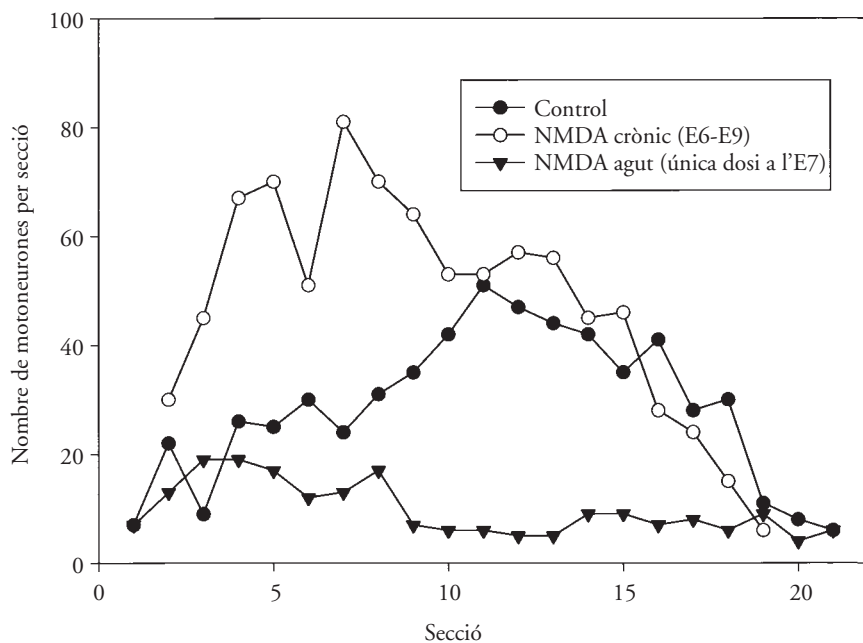


FIGURA 5. Nombre de MN a la banya anterior de la medulla espinal en sections seriades al llarg de l'engruiximent lumbo-sacre d'embrions de pollastre E10 en embrions controls i després d'un tractament amb una única dosi de NMDA a l'E7, o bé amb repetides dosis entre l'E5 i l'E9. Com és previsible, després 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.

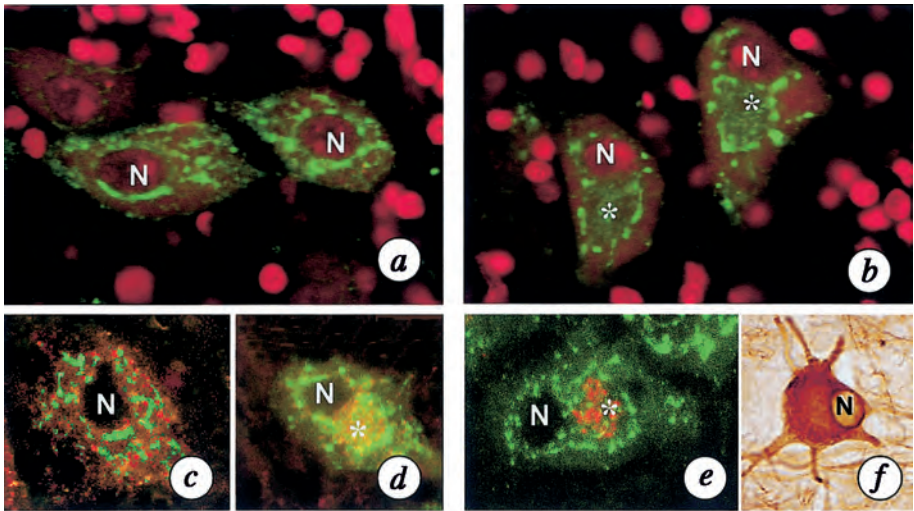
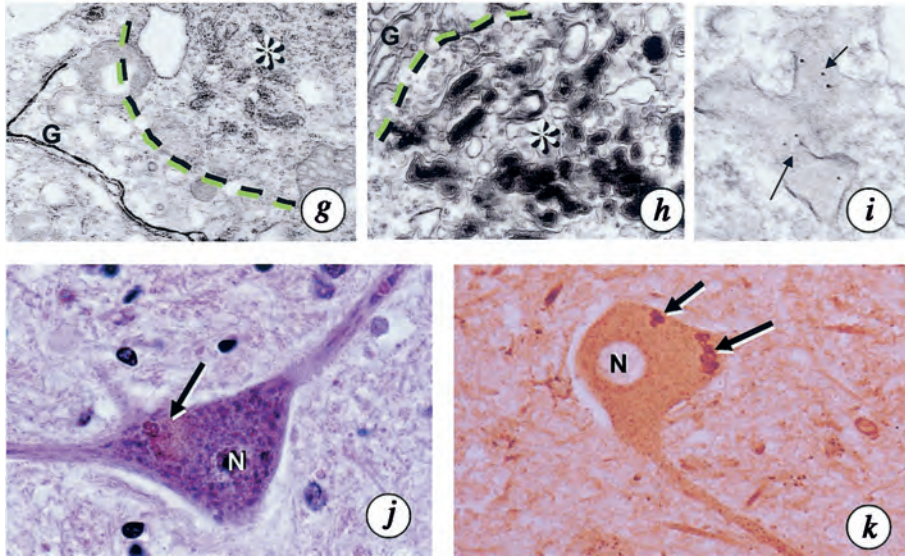


FIGURA 6. *a*) i *b*) MN d'embrions de pollastre E16 controls (*a*) i després del tractament crònic amb NMDA entre l'E5 i l'E9 (*b*) que mostren un doble marcatge fluorescent pel CGRP (verd) i pel DNA amb iodur de propidi. La N assenyalen els nuclis. El CGRP delimita l'aparell de Golgi, que té una disposició 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*).



# LA FUNCIÓ DEL ZINC EN EL SISTEMA NERVIÓS EN CONDICIONS NORMALS I PATOLÒGIQUES

Jeús Pérez i Clausell

*Departament de Biologia Cel·lular. Universitat de Barcelona*

## SUMMARY

Zinc is a trace element that is essential for living organisms. Zinc is present in hundreds of enzymes, in DNA regulatory complexes (zinc-fingers), in protective proteins... In addition, a pool of zinc is associated to secretory granules and also to synaptic vesicles in a group of synaptic boutons that use glutamate as neurotransmitter. These zinc rich boutons are particularly abundant in the forebrain and they arise from neurones in all cortical areas and in the amygdaloid complex. Zinc-rich boutons and neurones participate in cortico-cortical, cortico-striatal, hippocamposeptal and amygdalo-hypothalamic connections, among many others.

Zinc is released from synaptic boutons, interacts with postsynaptic glutamate receptors and modulates them. Indeed, zinc modulates synaptic transmission modifying synaptic facilitation (e.g. long-term potentiation).

Zinc appears to be involved in various pathologies and dysfunction of the nervous system. Zinc deficiencies lead to severe foetal malformations and growth retardation, and mild deficiencies render learning impairments in infants. Zinc may have a protective effect against epilepsy by inhibiting glutamate receptors (NMDA type). On the other hand, sprouting of mossy fibre collaterals after injury yields aberrant zinc-rich circuits, which appear to be the anatomical bases for temporal lobe epilepsy. In addition, zinc appears to be involved in excitotoxicity and may trigger cell death by entering postsynaptic neurones. *In vitro* studies also suggest a relation between zinc and apoptosis (related to caspase regulation) or Alzheimer (promoting the aggregation of  $\beta$ -amyloid). Therefore, zinc concentrations in the brain must be strictly regulated and a number of zinc transporters and sequestering proteins have been described.

Zinc is relevant to a wide variety of functions in the nervous system. Alteration in zinc concentrations by drugs or genetic manipulations may be a tool for basic research but also for therapeutics in connection with the pathologies mentioned above.

## RESUM

El zinc és un oligoelement essencial per als éssers vius. Hi ha zinc en centenars d'enzims, en complexos reguladors del DNA (*zinc-fingers*), en proteïnes amb funcions estructurals i protectores... A més, una part d'aquest zinc està associada als grànuls de secreció, i també a les vesícules sinàptiques d'un grup de botons sinàptics que utilitzen el glutamat com a neurotransmissor. Aquests botons rics en zinc són molt nombrosos en el telencèfal, i sorgeixen de neurones de totes les àrees corticals i de l'amígdala. Els botons i les neurones rics en zinc participen en les connexions corticocorticals, cortico-estriatals, hipocamposeptals i amigdalohipotàlmiques, entre moltes d'altres.

El zinc dels botons sinàptics s'allibera en arribar l'impuls nerviós, interacciona amb els receptors postsinàptics del glutamat i els modula. Aquesta modulació de la transmissió sinàptica afecta la plasticitat sinàptica, per exemple, la potenciació a llarg termini.

El zinc apareix associat a diversos trastorns del sistema nerviós. La manca de zinc provoca malformacions fetals greus i retards en el creixement infantil, i una lleu deficiència provoca dificultats en l'aprenentatge infantil. El zinc pot tenir un efecte protector contra l'epilèpsia per la inhibició dels receptors del glutamat (del tipus NMDA). D'altra banda, el creixement anormal de les fibres molsoses després d'una lesió pot ser la causa de l'epilèpsia del lòbul temporal humà. A més, el zinc està involucrat en l'excitotoxicitat i pot iniciar la mort neuronal en penetrar en les neurones postsinàptiques. Els estudis *in vitro* també suggereixen una relació entre el zinc i l'apoptosi (per la regulació de les caspases) o la malaltia d'Alzheimer (amb l'agregació del pèptid beta-amiloide). Per tant, les concentracions de zinc cerebral han d'estar molt ben regulades: s'han descrit diversos transportadors de zinc i proteïnes segrestadores.

El zinc intervé en una gran quantitat de funcions del sistema nerviós. Les alteracions de les concentracions de zinc amb fàrmacs o per manipulació genètica poden ser una eina útil per a la recerca bàsica, però també poden tenir, en un futur, aplicacions terapèutiques.

## LA TRANSMISSIÓ DE SENYALS EN EL SISTEMA NERVIÓS

La funció del zinc dins el sistema nerviós està íntimament relacionada amb les propietats de les neurones i dels contactes sinàptics. Per tant, abans de centrar-nos en el zinc, ens pot ser útil un repàs dels trets fonamentals d'aquestes estructures.



Com que es celebra el 150è aniversari del naixement de Santiago Ramón y Cajal, repassarem aquests trets agafant com a fil conductor les seves contribucions encara vigents avui en dia.

## NEURONA O RETICLE

A finals del segle XIX es qüestionava si el sistema nerviós estava format per una xarxa contínua de fibres nervioses (teoria reticulista) o per cèl·lules individuals amb prolongacions discretes que establien contactes les unes amb les altres (teoria neuronal). Ramón y Cajal defensava la teoria neuronal. Cajal descrivia els axons (els anomenava «cilindroejes») com a fibres nervioses delicades amb eixamplaments als extrems (botons sinàptics terminals) o al llarg de la fibra (botons «en passant»). Aquests terminals axònics entraven en relació estreta amb els cossos cel·lulars (cistells pericel·lulars), les ramificacions dendrítiques i les minúscules espines dendrítiques descrites per ell. En els seus dibuixos feia interpretacions funcionals i assenyalava amb fletxes la circulació d'informació per l'axó fins a arribar al cos o a les dendrites de la neurona següent. L'observació d'aquests contactes sinàptics formats per un botó axònic i un element postsinàptic separats per una distància de deu a vint milionèsimes de mil·límetre (10-20 nm) no va ser possible fins a la meitat del segle XX amb la introducció de les tècniques de microscòpia electrònica (Gray, 1959).

Com va poder arribar Ramón y Cajal a aquestes conclusions encertades amb cinquanta anys d'anticipació? Gràcies a unes preparacions histològiques de qualitat òptima i unes dots d'observació i interpretació extraordinàries. Cajal va dedicar un gran esforç a introduir millores en els protocols d'impregnació de les cèl·lules i fibres nervioses (Ramón y Cajal, 1889), i era molt acurat en la seva aplicació, la qual cosa li permetia obtenir unes preparacions excel·lents. A açò s'afegia un estudi minuciós de les preparacions i una gran clarividència en les seves anàlisis i interpretacions.

## LA SINAPSI QUÍMICA: ELS NEUROTRANSMISSORS

En un contacte sinàptic trobem l'element presinàptic (el botó), un petit espai de separació (la fenedura sinàptica) i l'element postsinàptic (una espina o una tija dendrítica, el cos de la neurona o el segment inicial de l'axó). Les sinapsis poden ser de dos tipus: elèctriques i químiques. Les elèctriques són comparables als nexes o unions amb fenedura (*gap junctions*) que hom troba en altres teixits. Aquestes sinapsis elèctriques permeten l'intercanvi ràpid d'ions i, per tant, l'acoblament elèctric de les cèl·lules. Són més freqüents en els invertebrats i al llarg del desenvolupament del sistema nerviós. En el cas de les sinapsis químiques, el botó sinàptic conté unes peti-

tes vesícules plenes d'unes molècules (els neurotransmissors) que s'alliberen a l'espai o fenedura sinàptica i actuen sobre l'element postsinàptic de la manera següent: el neurotransmissor s'uneix a molècules receptores i provoca l'obertura de canals iònics (figura 1). La circulació d'aquests ions provoca petits corrents excitadors (despolaritza la neurona, és a dir, es redueix la diferència de potencial elèctric a través de la membrana) (figura 1c) o inhibidors (hiperpolaritzen la neurona) (figura 1d). Si la suma de potencials excitadors i inhibidors ultrapassa un llindar, la neurona postsinàptica descarregarà un impuls nerviós robust (un potencial d'acció) (figura 1c).

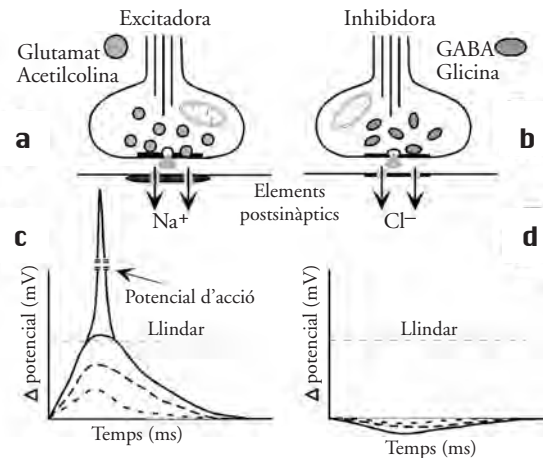


FIGURA 1. Morfologia i fisiologia de les sinapsis químiques. *a*) En una sinapsi excitadora, el botó sinàptic conté vesícules sinàptiques clares i rodones (vegeu també la figura 3). Aquestes alliberen el seu contingut a l'espai sinàptic. El neurotransmissor (glutamat o acetilcolina) s'uneix amb els seus receptors de la membrana de l'element postsinàptic i aquesta unió provoca l'obertura de canals de sodi. *b*) En una sinapsi inhibitori, el botó sinàptic conté vesícules sinàptiques clares, les quals, per un artefacte de la fixació amb aldehids, adopten una forma allargada. El neurotransmissor alliberat a l'espai sinàptic s'uneix als receptors de la membrana postsinàptica i provoca l'obertura de canals de clor. *c*) L'entrada de sodi en la cèl·lula postsinàptica provoca un petit corrent elèctric i una pujada del potencial de membrana (EPSP o *excitatory postsynaptic potential*). La coincidència d'EPSP pot fer que el potencial de membrana pugi fins a un llindar, la qual cosa provoca que la neurona receptora llanci un impuls nerviós pel seu axó (potencial d'acció). *d*) L'entrada de clor en la cèl·lula receptora provoca un corrent elèctric de sentit contrari i una baixada (es fa més negatiu) del potencial de membrana, és a dir, una hiperpolarització (IPSP o *inhibitory postsynaptic potential*).

Els neurotransmissors inhibidors característics són dos aminoàcids: la glicina i l'àcid gamma-aminobutíric. Entre els neurotransmissors excitadors trobem l'acetilcolina o els aminoàcids com l'aspartat o el glutamat. L'acetilcolina és el neuro-

transmissor de les sinapsis neuromusculars dels vertebrats. El glutamat és el neurotransmissor predominant del cervell dels vertebrats.

#### EL GLUTAMAT: NEUROTRANSMISSOR EXCITADOR

El glutamat és un aminoàcid que té una cadena lateral amb un altre grup àcid. És un component habitual de les proteïnes i intervé en nombrosos processos metabòlics.

El glutamat és el neurotransmissor característic dels circuits d'entrada a l'escorça cerebral (projeccions talamocorticals), dels circuits d'associació corticocortical i de les vies de sortida cortical (cap a l'estriat, el tàlem, el tronc cerebral i la medulla espinal).

El glutamat actua sobre els seus receptors postsinàptics i provoca l'obertura de canals permeables al sodi. Alguns canals també són permeables al calci, i també al zinc. Es reconeixen més de tres tipus de receptors del glutamat: els del tipus NMDA, AMPA i AMPA/kainat. I dins de cada grup hi ha diferències quant a les subunitats que els formen i les propietats fisiològiques que tenen (rapidesa i durada de la resposta, permeabilitat...).

TAULA 1. *Classificació dels receptors sinàptics del glutamat*

	<i>Ionotròpics</i>			<i>Metabotròpics</i>
	<i>NMDA</i>	<i>AMPA/kainat</i>		
		<i>AMPA</i>	<i>kainat</i>	
Subunitats	NR1 NR2A, NR2B	GluR1 a GluR4	GluR5 a GluR7 KA1 i KA2	mGluR1 a mGluR8

Quan un receptor conté un canal iònic (ionòfor) o hi està acoblat, la unió del neurotransmissor amb el receptor provoca l'obertura del canal i un flux ràpid d'ions que té un efecte breu (mil·lisegons). Aleshores, hom parla de *receptors ionotròpics*. En altres casos, els receptors estan acoblats a la producció de segons missatgers (proteïna G, AMP cíclic...), els quals provoquen canvis de llarga durada dins la cèl·lula receptora. Són els *receptors metabotròpics*. Dins dels receptors del glutamat trobem una àmplia varietat de receptors ionotròpics i metabotròpics.

Els receptors del glutamat estan relacionats amb els fenòmens de la plasticitat sinàptica. És a dir, l'activitat freqüent d'una sinapsi pot donar origen a un increment (facilitació) o una disminució (depressió) del seu efecte. Alguns d'aquests canvis tenen una durada breu (mil·lisegons) però d'altres es mantenen uns quants minuts, hores i fins i tot dies. Els receptors de NMDA estan involucrats en els fenòmens de potenciació a llarg termini, una mena de «memòria» dels circuits sinàptics.

Els receptors del glutamat (NMDA i AMPA) també tenen efectes negatius per a les neurones. Intervenien en el fenomen de la mort neuronal per sobreexcitació o excitotoxicitat (Choi, 1988): una descàrrega excessiva d'aquest circuits amb glutamat provoca l'entrada de calci en la neurona postsinàptica, la qual cosa inicia una seqüència de canvis (alteracions als mitocondris, generació de radicals lliures, inflació de la neurona...) que condueix a la mort neuronal (Choi, 1988). L'excitotoxicitat és la causa de mort neuronal en les lesions cerebrals més comunes com ara la isquèmia (patiments fetals del part, obstrucció dels vasos sanguinis en adults...) (Akai i Yanagihara, 1993), convulsions febrils dels infants, epilèpsia (Olney *et al.*, 1983; Dudek i Spitz, 1997; Ben Ari i Cossart, 2000), traumatismes craneoencefàlics (accidents de circulació...) i algunes malalties neurodegeneratives (per exemple, l'esclerosi lateral amiotròfica) (vegeu l'article del doctor Esquerda en aquest mateix llibre).

## EL ZINC EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

### EL ZINC: UN OLIGOELEMENT

El zinc és un element metàl·lic amb tonalitats blavoses. La producció mundial d'aquest metall excedeix els set milions de tones anuals. Té usos industrials molt amplis. S'utilitza en la galvanització del ferro per prevenir que es rovelli. També s'utilitza en la fabricació de bateries (piles) i per a l'estabilització del cautxú i plàstics (en forma d'òxid de zinc) (Berg i Shi, 1996; International Zinc Association, 2003). Pot donar problemes de contaminació industrial, però en dóna menys que altres elements com ara el cadmi, el mercuri o el plom.

El zinc és un element essencial per als éssers vius (Berg i Shi, 1996; International Zinc Association, 2003). El cos humà conté al voltant de 2,5 g de zinc. I en necessitem uns 15 mg diaris per mantenir-nos (uns 10 mg en el cas dels infants). Una dieta equilibrada ens proporciona aquesta quantitat amb escreix. Hi ha aliments rics en zinc, per exemple, les carns roges (bovines i ovines), alguns peixos (arengades) i marisc, llavors (gira-sol i altres fruits secs) i formatges. Els llegums, els cereals, els ous i la llet també aporten zinc a la dieta (Berg i Shi, 1996; International Zinc Association, 2003). La manca de zinc va lligada a la desnutrició, a dietes molt pobres en quantitat i varietat. Es dóna en països del tercer món i fins i tot en països en vies de desenvolupament (al Kurdistan o a l'Amèrica andina), i en casos de malnutrició associada a l'alcoholisme i altres drogodependències. De tota manera, també podem trobar dietes lleugerament pobres en zinc en els països desenvolupats, en famílies pobres amb dietes poc variades que consisteixen gairebé de manera exclusiva en hidrats de carboni. Per exemple, als Estats Units, els nens de la meitat de les famílies de renda baixa i un 30 % de la resta de famílies tenen dietes baixes en zinc (inferiors al 70 % de la quantitat recomanada) (International Zinc Association, 2003; Universitat Tufts, 2003).

## EL ZINC I LES VESÍCULES SINÀPTIQUES

En els éssers vius el zinc es troba associat a proteïnes amb activitat catalítica (enzims), proteïnes estructurals, factors reguladors del DNA (dits de zinc o *zinc-fingers*), etc. (Cuajungco i Lees, 1997; Frederickson *et al.*, 2000; Frederickson i Bush, 2001). En tots aquest casos el zinc es troba unit fortament a la proteïna. També trobem una petita part del zinc amb unions febles al teixit; aquest zinc pot detectar-se fàcilment amb tècniques de tinció específiques (mètodes histoquímics) (Danscher, 1981, 1982; Frederickson *et al.*, 1987*a*) (figura 2). Aquests mètodes demostren que en el sistema nerviós, hi ha zinc a les vesícules sinàptiques d'alguns botons sinàptics, que anomenem *botons rics en zinc* (Haug, 1967; Friedman i Price, 1984; Pérez-Clausell i Danscher, 1985; Dyck *et al.*, 1993) (figura 3). Aquests botons es troben per tot el cervell i la medulla espinal, però són particularment abundants en el telencefal: en l'escorça cerebral, l'estriat, el complex amigdalí, el septel... (Haug, 1973; Mengual *et al.*, 1995, 2001; Pérez-Clausell, 1996) (figures 2 i 5).

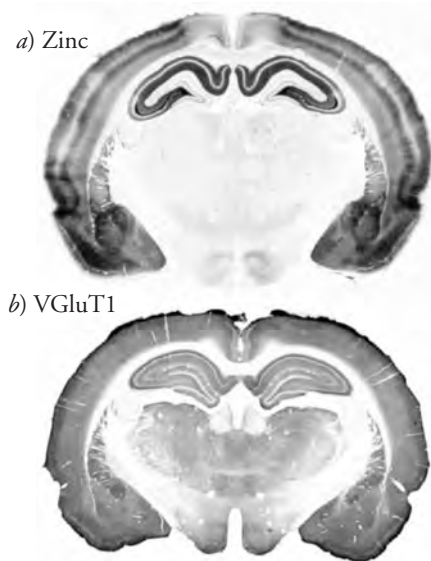


FIGURA 2. Talls transversals de cervell de la rata on es mostra la tinció histoquímica per al zinc (mètode de Timm del sulfur i la plata) i la detecció immunohistoquímica d'un transportador vesicular del glutamat (VGluT1). *a*) El zinc (en realitat, botons sinàptics rics en zinc) es distribueix per tota l'escorça cerebral, inclosos l'hipocamp, l'amígdala i l'estriat. Hi ha poca reacció en el tàlem i hipotàlem. *b*) El transportador del glutamat VGluT1 (Varoqui *et al.*, 2002) està situat a la membrana de les vesícules sinàptiques i per tant ens marca botons sinàptics. La seva distribució és bastant coincident amb la del zinc.

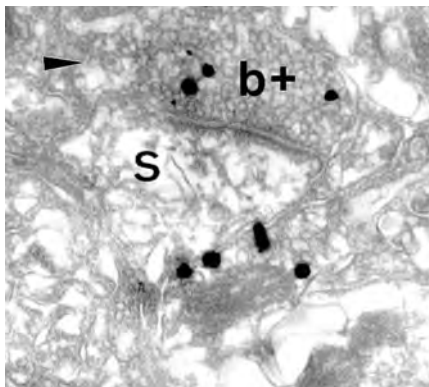


FIGURA 3. Imatge de microscòpia electrònica on s'observa un botó sinàptic ric en zinc (b+) ple de vesícules sinàptiques rodones i clares. Sobre aquestes vesícules observem el marcat esporàdic de grans de plata (negres), que ens indiquen la presència de zinc. El botó b+ fa contacte sinàptic asimètric amb una espina dendrítica (s).

Hi ha mètodes específics que ens permeten trobar les neurones que donen origen a aquests botons sinàptics. Es basen en la injecció *in vivo* de sals de seleni, la precipitació del zinc i el seu transport fins al cos de la neurona (transport o traçat retrògrad) (Slomianka *et al.*, 1990; Howell i Frederickson, 1990) (figura 4). Posteriorment, els precipitats es revelen per una amplificació amb sals de plata (similar a un revelat fotogràfic) (Danscher, 1982). Aquest mètodes demostren que hi ha neurones riques en zinc per tot el cervell i la medul·la, però que es concentren sobretot a l'escorça cerebral i el complex amigdalí (Garrett *et al.*, 1992; Casanovas-Aguilar *et al.*, 1995, 1998, 2002; Sørensen *et al.*, 1995; Christensen i Geneser, 1995) (figura 5).

Els circuits nerviosos rics en zinc intervenen en les nombroses connexions d'associació entre les àrees de l'escorça cerebral (projeccions corticocorticals) (Garrett *et al.*, 1992; Casanovas-Aguilar *et al.*, 1995, 1998, 2002), entre l'escorça cerebral i l'amígdala i entre els mateixos nuclis de l'amígdala (Pérez-Clausell *et al.*, 1989; Christensen i Geneser, 1995). També intervenen en les projeccions descendents des de l'escorça cerebral fins a l'estriat (nuclis caudat i putamen) (Sørensen *et al.*, 1995), en la projecció hipocamposeptal (Sørensen *et al.*, 1993) i en les projeccions descendents des de l'amígdala i l'hipocamp fins a l'hipotàlem (Pérez-Clausell *et al.*, 1989). Recentment s'han trobat també en projeccions ascendents (des de la formació reticular mesencefàlica fins al tàlem) (Mengual *et al.*, 2001) i en circuits de la medul·la espinal (Larson *et al.*, 2000; Jo *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2000).

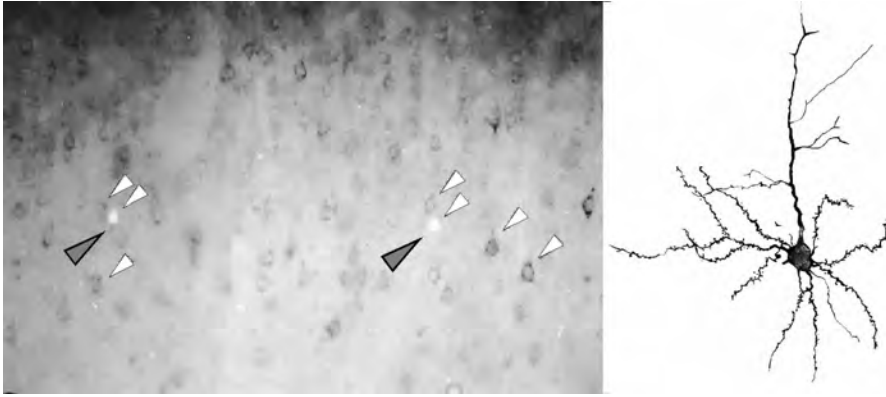


FIGURA 4. Transport retrògrad de precipitats de zinc. La rata va rebre una injecció intracortical de selenit sòdic a fi de precipitar el zinc dels botons sinàptics. Vint-i-quatre hores després de l'operació, els precipitats s'han transportat cap enrere al llarg de l'axó fins a arribar al cos de la neurona (precipitats negres; alguns exemples estan assenyalats amb puntes blanques). Dues d'aquestes neurones van rebre, posteriorment, una injecció intracel·lular d'un marcador fluorescent i biotinitat (el cos de les dues neurones es veu blanc; assenyalat amb dues puntes grises). El marcat intracel·lular es revela posteriorment amb estreptoavidina-peroxidasa, diaminobenzidina i aigua oxigenada. El producte de la reacció ens mostra la morfologia de les neurones riques en zinc (dibuix a càmera clara fet per Neus Miró i Bernié).

Els botons sinàptics rics en zinc els trobem al llarg de tota l'escala evolutiva dels vertebrats: peixos (Piñuela *et al.*, 1992*a*, 1992*b*), amfibis, rèptils (López-García *et al.*, 1983; Pérez-Clausell, 1988; Smeets *et al.*, 1989), aus i mamífers (rosegadors, felins, primats..., fins i tot al cervell humà) (Haug, 1973; Sánchez-Andrés *et al.*, 1997; Franco-Pons *et al.*, 2000).

Els circuits rics en zinc estan molt conservats en tots els grups estudiats. Per exemple, la projecció hipocamptoseptal es troba tant en rèptils com en mamífers (López-García *et al.*, 1983). I el mateix passa amb la projecció des de l'amígdala fins al nucli ventromedial hipotalàmic, entre altres exemples (Pérez-Clausell, 1988; Pérez-Clausell *et al.*, 1989). Aquesta conservació evolutiva ens suggereix que el zinc pot tenir alguna funció clau en la fisiologia del sistema nerviós.

Els circuits rics en zinc solen coincidir amb circuits que han estat descrits com a circuits glutamatèrgics (que utilitzen el glutamat com a neurotransmissor) (figura 2). A més, els estudis en microscòpia electrònica han permès la localització conjunta de zinc i marcadors del glutamat en els mateixos botons sinàptics (Martínez-Guijarro *et al.*, 1991; Beaulieu *et al.*, 1992; Balet-Sindreu *et al.*, 2003). Malgrat açò, hi ha circuits glutamatèrgics que no donen origen a botons rics en zinc, per exemple, la

projecció de les cèl·lules granulars sobre l'estrat molecular del cerebel (les fibres paral·leles) (Haug, 1973; Danscher, 1981). Per tant, en una primera aproximació podem dir que els circuits rics en zinc són glutamatèrgics, però que hi ha molts circuits glutamatèrgics que *no* tenen zinc. I encara s'hauria de matisar més: ens podem trobar amb circuits rics en zinc que siguin inhibidors (amb glicina o GABA), sobretot en la medul·la espinal (Larson *et al.*, 2000; Jo *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2000).

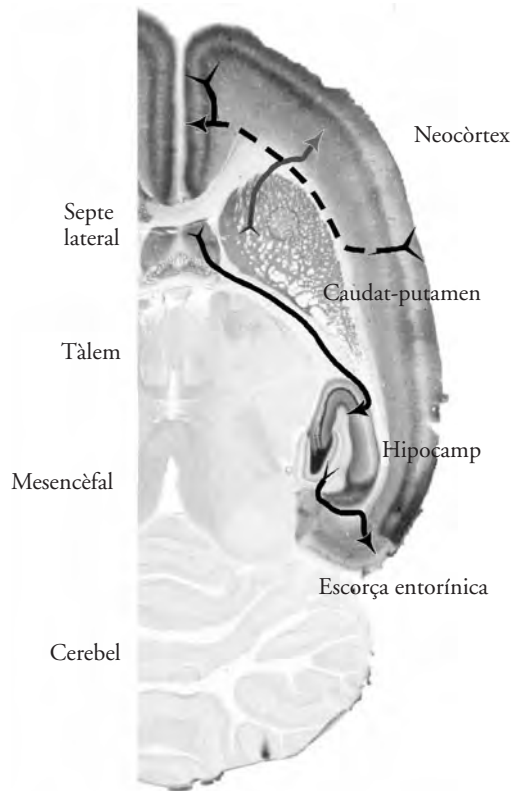


FIGURA 5. Els mètodes d'injecció de seleni ens permeten el traçat dels circuits neuronals rics en zinc. Per exemple, la projecció corticocortical, corticoestriatal, hipocamposeptal i la via perforant des del còrtex entorínic fins al gir dentat. El tàlem, i el cervell mitjà i posterior (mesencèfal, cerebel...) són pobres en circuits en zinc.



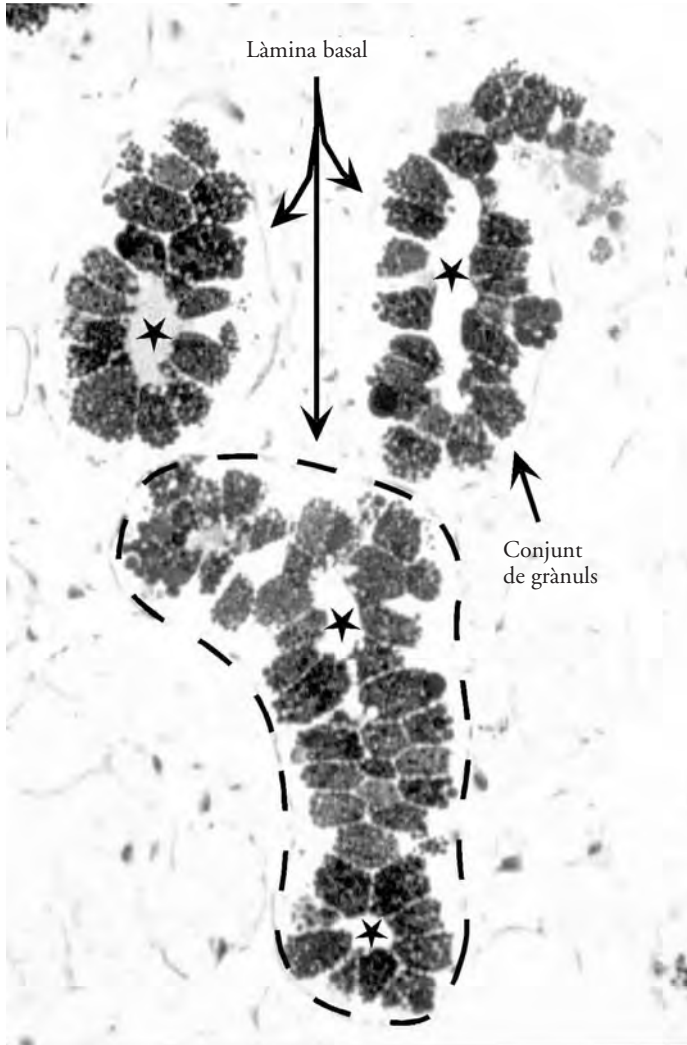


FIGURA 6. Conductes secretors de la glàndula submandibular d'un ratolí mascle on s'observa la presència de zinc en la zona dels grànuls de secreció proteica. De fet, el zinc es localitza a l'interior dels grànuls de secreció, on podria tenir la funció de contribuir a l'empaquetament de les proteïnes dins del grànul (Frederickson *et al.*, 1987*b*; Frederickson i Danscher, 1988). Els quatre símbols amb forma d'estrella indiquen la llum del conducte secretor.

## EL ZINC I LA MODULACIÓ DEL GLUTAMAT

*L'addició de zinc*

Els estudis fisiològics i farmacològics realitzats amb llesques o llonzes de teixit nerviós (experiments *in vitro*), han establert que el zinc (zinc exogen, afegit al medi d'incubació) pot ser un modulador d'una gran quantitat de canals iònics lligats als receptors de glutamat, GABA o glicina, i altres canals no acoblats a receptors (canals de calci sensibles al voltatge...) (Westbrook i Mayer, 1987; Peters *et al.*, 1987; Harrison i Gibbons, 1994; Smart *et al.*, 1994).

Si hom es centra en els receptors del glutamat, observa que l'addició de zinc redueix la resposta dels receptors del glutamat del tipus NMDA i potencia la del tipus AMPA (Westbrook i Mayer, 1987; Peters *et al.*, 1987). Però no tots aquests receptors responen al zinc de manera homogènia. En el primer cas, el zinc s'uneix amb més afinitat a les subunitats NR2A dels receptors NMDA. En el cas dels receptors AMPA, aquests són impermeables al zinc (i al calci) quan contenen la subunitat GluR2.

*El zinc endogen*

Els experiments anteriors demostren que l'addició de zinc (a vegades en concentracions molt elevades) té efectes sobre la resposta sinàptica. Però, les petites quantitats que es poden alliberar *in vivo*, tenen també aquest efecte? S'ha observat que el segrest del zinc (amb agents quelants extracel·lulars) provoca un augment dels corrents elèctrics en les sinapsis de les fibres molsoses de l'hipocamp de la rata (Vogt *et al.*, 2000). Aquest efecte es produeix a través dels receptors NMDA. Per tant, cal suposar que un dels efectes del zinc sinàptic és la inhibició dels receptors NMDA postsinàptics. De la mateixa manera, en estudis més recents, s'ha observat que el segrest del zinc provoca una major potenciació a llarg termini (LTP) de les sinapsis de l'estrat radiat de la regió CA1 de l'hipocamp. Es a dir, el zinc, en condicions fisiològiques, fa que aquestes sinapsis siguin més resistents a la potenciació (Balet-Sindreu i Jensen, comunicació personal).

## EL ZINC EN CONDICIONS PATOLÒGIQUES

*La manca de zinc provoca trastorns en el desenvolupament físic i mental*

El zinc és un oligoelement essencial per al desenvolupament fetal i postnatal dels individus (Berg i Shi, 1996). Una dieta amb una deficiència important en el

contingut de zinc provoca malformacions fetals greus. La deficiència de zinc en períodes postnats (en infants i adolescents) provoca retards en el creixement, en el desenvolupament del sistema nerviós i dels òrgans sexuals (Fosmire *et al.*, 1975; Hesse, 1979; Cuajungco i Lees, 1997; Sandstead, 2000; Saito *et al.*, 2000; Takeda, 2001). També provoca trastorns del sentit del gust, reducció de l'apetit, i per tant, menor ingestió de menjar, juntament amb pèrdua de pes (International Zinc Association, 2003). Una deficiència lleu en la dieta, molt freqüent fins i tot en països desenvolupats, provoca deficiències en l'aprenentatge i alteracions del comportament, i en conseqüència, un menor rendiment escolar de la població infantil (Penland, 2000). Si s'administren suplementes de zinc per compensar aquestes deficiències, millora aquest rendiment escolar.

*El segrest del zinc provoca descàrregues epileptiformes i potencia l'efecte neurotòxic de l'àcid kaínic*

Els estudis *in vitro* amb llesques de teixit nerviós (de l'hipocamp) demostren que l'eliminació del zinc mitjançant compostos segrestants (agents quelants) provoca una major activitat neuronal, juntament amb l'aparició de descàrregues epileptiformes (Xu i Mitchell, 1993). Els estudis *in vivo* d'animals tractats amb agents convulsionants (àcid kaínic) ens mostren que la mort neuronal es veu incrementada quan administrem conjuntament agents quelants (Lees *et al.*, 1998; Larson *et al.*, 2000). L'estudi d'animals amb modificacions genètiques (transgènics) en què s'han eliminat alguns transportadors del zinc, demostren canvis quan tractem aquests animals amb agents convulsionants (Cole *et al.*, 2000). En tots aquests casos, el segrest o l'absència del zinc té efectes negatius, per la qual cosa podem suposar que la presència del zinc pot tenir una funció protectora davant les convulsions, potser a través de la inhibició sobre els receptors del glutamat que abans hem comentat.

*En models animals d'epilèpsia del lòbul temporal s'observa un creixement anormal (sprouting) de circuits rics en zinc*

L'epilèpsia es una malaltia relativament freqüent (afecta un 0,5 % de la població, és a dir, una de cada dues-centes persones). L'epilèpsia consisteix en alteracions sobtades i recurrents de l'activitat motora (convulsions), sensorial (al·lucinacions) o dels estats de consciència (absències o pèrdues de consciència) provocats per una activitat neuronal excitadora excessiva i reiterada. Més que una malaltia, són un conjunt de símptomes amb causes molt variades.

L'epilèpsia del lòbul temporal humà és un tipus d'epilèpsia on el focus epilèptic es localitza en l'hipocamp (freqüentment en un sol dels hipocamps) i s'estén posteriorment per tot el lòbul temporal (Sloviter, 1994; Dudek i Spitz, 1997; Ben Ari i Cossart, 2000). La causa d'aquesta epilèpsia podria estar en les convulsions febrils de la infantesa, les quals podrien arribar a lesionar algunes neurones sensibles de l'*hilus* del gir dentat (una part de l'hipocamp). Les lesions amb injeccions intraperitoneals d'àcid kaïníc en rates de laboratori reproduïxen amb certa fidelitat les lesions observades en humans (Ben Ari, 1985). En ambdós casos, en rates i en humans, s'observa la mort de neurones en l'*hilus* del gir dentat. Aquestes cèl·lules reben contactes de botons sinàptics rics en zinc que provenen de les cèl·lules granulars del gir dentat. En desaparèixer les neurones receptores de l'*hilus*, els botons sinàptics rics en zinc perden el seu contacte habitual i aleshores els axons creixen buscant un nou lloc de contacte. I ho fan en l'estrat molecular del mateix gir dentat (Cavazos i Sutula, 1990; Sloviter, 1994; Yang *et al.*, 1998). El creixement aberrant d'aquests circuits rics en zinc provocaria que un estat convulsiu ocasional es transformés en crònic.

*En casos d'isquèmia o trauma, el zinc s'acumula en neurones en degeneració (podria provocar la mort)*

El zinc pot entrar dins les cèl·lules postsinàptiques a través dels canals iònics activats durant la neurotransmissió, per exemple, a través de receptors AMPA/kaïnàt o canals de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltatge (VSCC o *voltage-sensitive calcium channels*). Aquest és un fenomen normal en la transmissió mitjançant el neurotransmissor glutamat: el glutamat i el zinc s'alliberen des de l'element postsinàptic (Assaf i Chung, 1984; Howell *et al.*, 1984), actuen sobre els receptors postsinàptics i provoquen l'obertura de canals iònics. A més, alguns ions de calci o de zinc ( $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ ) podrien entrar en la cèl·lula postsinàptica, on actuarien com a senyals (segons missatgers) que iniciarien canvis en l'activitat cel·lular.

A banda d'això, en els casos d'isquèmia cerebral, convulsions, lesions traumàtiques o químiques (causades per neurotòxics) es produeix un alliberament excessiu de glutamat que origina una excitació excessiva de la neurona receptora i acaba provocant l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cèl·lula receptora i la mort neuronal. Parlem de mort neuronal per excitotoxicitat, com ja s'ha comentat. En aquests casos, també es produirà un alliberament de zinc i l'entrada dins la neurona receptora a través dels canals ja descrits (Choi i Koh, 1998). Els estudis *in vitro* demostren que l'entrada de zinc altera el funcionament mitocondrial i provoca un augment de grups peròxid i altres radicals lliures (ROS o *reactive oxygen species*) i la mort neuronal (Sensi *et al.*, 1999, 2000). El zinc també podria activar algunes molècules reguladores de la via de les caspases que regulen l'apoptosi o mort cel·lular programada (Cuajungco i Lees, 1997).

L'anàlisi microscòpica en casos d'isquèmia, trauma, etc., demostren l'acumulació de zinc a l'interior de cèl·lules en degeneració (Koh *et al.*, 1996; Lees *et al.*, 1998; Larson *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2000). Però d'on prové aquest zinc? Si ens fixem en el glutamat, hom sap que el glutamat alliberat prové en part dels botons sinàptics, però la majoria ve de les reserves citoplasmàtiques que són alliberades a l'exterior a causa de la despolarització de les neurones i del funcionament invers dels transportadors del glutamat, que bombegen cap a fora en lloc de fer-ho cap a dins (Rossi *et al.*, 2000). De la mateixa manera, el zinc podria alliberar-se des del botó sinàptic o des del citoplasma cel·lular.

En resum, el zinc s'acumula en neurones en vies de degeneració, però no acaba de quedar clar d'on prové aquest zinc. Tampoc no sabem si l'acumulació de zinc és la causa o la conseqüència de la mort neuronal.

*Les concentracions de zinc alterades en la malaltia d'Alzheimer. El zinc promou l'agregació del pèptid beta-amiloide*

Un problema semblant el trobem en la relació del zinc amb la malaltia d'Alzheimer. Hi ha concentracions elevades de zinc en mostres de teixit cerebral obtingut d'autòpsies a malalts d'Alzheimer (Cuajungco i Lees, 1997; Danscher *et al.*, 1997). Però és açò una conseqüència o una causa?

En la malaltia d'Alzheimer es pot observar que el citoesquelet de les neurones està alterat i que forma un garbuix de filaments (*fibrillary tangles*). A més, s'observa l'acumulació extracel·lular de proteïnes que dona lloc a les anomenades *plaques amiloides*, on el pèptid beta-amiloide es troba agregat de manera insoluble. En sistemes *in vitro*, hom ha observat que la presència de zinc afavoreix la precipitació del pèptid beta-amiloide per formar agregats (Mantyh *et al.*, 1993; Bush *et al.*, 1994; Multhaup *et al.*, 1994; Esler *et al.*, 1996; Lovell *et al.*, 1999).

## LA REGULACIÓ DEL ZINC

El teixit nerviós té concentracions de zinc que oscil·len al voltant dels 40-70 ppm (40-70 µg de zinc per cada gram de teixit sec, sense el contingut d'aigua) (Frederickson *et al.*, 1982, 1983; Klitenick *et al.*, 1983; Andrasi *et al.*, 1999). A causa del gran nombre de funcions diverses que té el zinc (en enzims, proteïnes reguladores...) aquestes concentracions han d'estar molt controlades. Els experiments amb zinc radioactiu determinen que el zinc cerebral està ben regulat i la velocitat de recanvi és lenta (Tanaka, Jr., 1987; Takeda, 2001).

El control del zinc cerebral dependrà de proteïnes transportadores de les mem-

branes cel·lulars, que en permetran la captació i l'alliberament, i de proteïnes i altres molècules segrestadores, que el podran retenir.

### *Transportadors*

Pel que fa als transportadors de zinc, s'han descrit dues grans famílies basades en els estudis fets en llevats: els transportadors ZIP (*Zrt-, Irt-like Protein*, proteïnes semblants als transportadors Zrt i Irt dels llevats) i els CDR (*Cation Diffusion Facilitator* o facilitadors de la difusió de cations) (Gaither i Eide, 2001). Els primers transporten el zinc cap al compartiment citoplasmàtic (des de l'exterior cel·lular, en el cas de la membrana plasmàtica, o des de la llum dels orgànuls, en el cas de les endomembranes). Els de la família CDR transporten el zinc des del compartiment citoplasmàtic cap a l'exterior cel·lular o l'interior dels orgànuls.

Recentment, s'han descrit en els rosegadors una sèrie de transportadors anomenats ZnT (*zinc transporter*), els quals pertanyen a la família dels transportadors CDR: transporten zinc des del citoplasma cap a l'exterior (ZnT1, ZnT2) (Palmiter *et al.*, 1996*a*) o cap a l'interior de les vesícules sinàptiques (ZnT3) (Palmiter *et al.*, 1996*b*). Alguns d'aquests semblen específics del cervell (ZnT3) però n'hi ha d'altres amb distribucions molt variades (glàndules mamàries, epitelis de revestiment, testicles...) (Rolfs i Hediger, 1999; Colvin *et al.*, 2000; Takeda, 2001).

### *Metal·lotioneïnes*

El zinc tissular no acostuma a estar lliure, sinó que es troba associat a molècules reguladores petites, com pot ser el glutatió, o associat a proteïnes interaccionant amb els residus cisteïna i histidina (Takeda, 2000, 2001). Una part del zinc cerebral està unit a les metal·lotioneïnes. Es tracta de proteïnes amb capacitat d'unir-se a un gran nombre d'àtoms metàl·lics, generalment zinc o coure, però en casos d'intoxicació per metalls es promou la síntesi d'aquestes proteïnes i poden segrestar el cadmi i altres metalls pesats (Aschner, 1996). A banda de la seva capacitat segrestadora de metalls, les metal·lotioneïnes actuen com a proteïnes protectores en resposta a agressions cel·lulars com a conseqüència de lesions, inflamació... (Ebadi *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 1998; Yanagitani *et al.*, 1999). El zinc pot contribuir a la funció positiva d'aquestes metal·lotioneïnes durant el desenvolupament, en la resposta inflamatòria, després de lesions isquèmiques... (Ono *et al.*, 1997; Ono i Cherian, 1998; Penkowa *et al.*, 1999, 2001; Velázquez *et al.*, 1999; Yanagitani *et al.*, 1999).

*Cap a on anem?*

En 1999 es va crear a Nova York el ZINC o Zinc Information Nutrition Center, en el qual participa la Universitat de Rochefeller i l'Hospital de Nova York (International Zinc Association, 2003). El ZINC té com a objectiu informar els consumidors i els professionals de la salut i l'educació sobre la importància del zinc per a una vida sana, tan important o més que el ferro i moltes vitamines. Tot i que ha estat menysvalorada fins ara, la deficiència de zinc en la dieta apareix com un fenomen freqüent amb importància per al desenvolupament físic i mental dels nens, i també per a l'estat de salut dels adolescents i els adults.

A més d'aquestes funcions generals com a oligoelement necessari (similar a les vitamines), el zinc té unes funcions molt particulars en la regulació de la transmissió nerviosa excitadora. I al mateix temps, el zinc està relacionat amb les lesions neuronals associades als accidents vasculars cerebrals, patiments fetals, convulsions i algunes malalties degeneratives.

Si tenim en compte aquests darrers efectes tan perillosos, és obvi que hem d'avançar en el control del zinc cerebral mitjançant fàrmacs segrestadors (quelants) exclusius del zinc, o inhibidors dels transportadors de zinc de la membrana cel·lular o dels orgànuls. La manipulació de l'expressió gènica d'aquests transportadors o d'altres proteïnes reguladores del zinc també pot ser una bona estratègia. Si seguim aquest camí, ens podem trobar a curt o a mitjà termini amb unes eines interessants per a la recerca, les quals poden tenir aplicació clínica a llarg termini en el tractament de les lesions neuronals esmentades abans.

## AGRAÏMENTS

Les fotografies presentades i el treball experimental al qual fan referència han estat realitzats pel nostre Grup de Neurobiologia del Zinc del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de Barcelona, en particular per la doctora Carme Casanovas i Aguilar i els estudiants de doctorat Carles Balet i Sindreu, Neus Miró i Bernié, i Àngela Riba i Bosch. Agraïxo especialment a la doctora Mercè Durfort l'organització d'aquests actes de commemoració del naixement de Santiago Ramón y Cajal. Els treballs esmentats han estat subvencionats pel Ministeri d'Educació i Cultura (PM97-0048-CO2-02) i el Ministeri de Sanitat i Consum (FIS 01/0096-02).

## BIBLIOGRAFIA

- AKAI, F.; YANAGIHARA, T. (1993). «Identity of the dorsal hippocampal region most vulnerable to cerebral ischemia». *Brain Res.*, núm. 603, p. 87-95.
- ANDRASI, E.; IGAZ, S.; SZOBOSZLAI, N.; FARKAS, E.; AJTONY, Z. (1999). «Several methods to determine heavy-metals in the human brain». *Spectrochim. Acta Pt. B At. Spec.*, núm. 54:, p. 819-825.
- ASCHNER, M. (1996). «The functional significance of brain metallothioneins». *FASEB J.*, núm. 10, p. 1129-1136.
- ASSAF, S. Y.; CHUNG, S. H. (1984). «Release of endogenous Zn<sup>2+</sup> from brain tissue during activity». *Nature*, núm. 308, p. 734-736.
- BALET-SINDREU, C.; VAROQUI, H.; ERICKSON, J. D.; PÉREZ-CLAUSELL, J. (2003). «Boutons containing vesicular zinc define a subpopulation of synapses with low AMPAR content in rat hippocampus». *Cerebral Cortex*, núm. 13, p. 823-829.
- BEAULIEU, C.; DYCK, R.; CYNADER, M. (1992). «Enrichment of glutamate in zinc-containing terminals of the cat visual cortex». *NeuroReport*, núm. 3, p. 861-864.
- BEN ARI, Y. (1985). «Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy». *Neuroscience*, núm. 14, p. 375-403.
- BEN ARI, Y.; COSSART, R. (2000). «Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress». *Trends Neurosci.*, núm. 23, p. 580-587.
- BERG, J. M.; SHI, Y. (1996). «The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc». *Science*, núm. 271, p. 1081-1085.
- BUSH, A. I.; PETTINGELL, W. H.; MÜLTHAUP, G.; PARADIS, M.; VONSATTEL, J. P.; GUSELLA, J. F.; BEYREUTHER, K.; MASTERS, C. L.; TANZI, R. E. (1994). «Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc». *Science*, núm. 265, p. 1464-1467. [Vegeu els comentaris]
- CASANOVAS-AGUILAR, C.; CHRISTENSEN, M. K.; REBLET, C.; MARTÍNEZ-GARCIA, F.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; BUENO-LÓPEZ, J. L. (1995). «Callosal neurones give rise to zinc-rich boutons in the rat visual cortex». *NeuroReport*, núm. 6, p. 497-500.
- CASANOVAS-AGUILAR, C.; MIRO-BERNIE, N.; PÉREZ-CLAUSELL, J. (2002). «Zinc-rich neurones in the rat visual cortex give rise to two laminar segregated systems of connections». *Neuroscience*, núm. 110, p. 445-458.
- CASANOVAS-AGUILAR, C.; REBLET, C.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; BUENO-LÓPEZ, J. L. (1998). «Zinc-rich afferents to the rat neocortex: projections to the visual cortex traced with intracerebral selenite injections». *J. Chem. Neuroanat.*, núm. 15, p. 97-109.
- CAVAZOS, J. E.; SUTULA, T. P. (1990). «Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis». *Brain Res.*, núm. 527, p. 1-6. [Fe d'errates publicada a *Brain Res.*, vol. 1, núm. 541 (8 febrer 1991), p. 179]
- CHOI, D. W. (1988). «Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system». *Neuron*, núm. 1, p. 623-634.
- CHOI, D. W.; KOH, J. Y. (1998). «Zinc and brain injury». *Annu. Rev. Neurosci.*, núm. 21, p. 347-375.
- CHRISTENSEN, M. K.; GENESER, F. A. (1995). «Distribution of neurons of origin of zinc-



- containing projections in the amygdala of the rat». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 191, p. 227-237.
- COLE, T. B.; ROBBINS, C. A.; WENZEL, H. J.; SCHWARTZKROIN, P. A.; PALMITER, R. D. (2000). «Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc». *Epilepsy Res.*, núm. 39, p. 153-169.
- COLVIN, R. A.; DAVIS, N.; NIPPER, R. W.; CARTER, P. A. (2000). «Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons». *J. Nutr.*, núm. 130 (5 supl.), p. 1484S-1487S.
- CUAJUNGCO, M. P.; LEES, G. J. (1997). «Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders». *Neurobiol. Dis.*, núm. 4, p. 137-169.
- DANSCHER, G. (1981). «Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy». *Histochemistry*, núm. 71, p. 1-16.
- (1982). «Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds». *Histochemistry*, núm. 76, p. 281-293.
- DANSCHER, G.; JENSEN, K. B.; FREDERICKSON, C. J.; KEMP, K.; ANDREASEN, A.; JUHL, S.; STOLTENBERG, M.; RAVID, R. (1997). «Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's diseased brains: a proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material». *J. Neurosci. Methods*, núm. 76, p. 53-59.
- DUDEK, F. E.; SPITZ, M. (1997). «Hypothetical mechanisms for the cellular and neurophysiologic basis of secondary epileptogenesis: proposed role of synaptic reorganization». *J. Clin. Neurophysiol.*, núm. 14, p. 90-101. [Fe d'errates publicada a *J. Clin. Neurophysiol.*, vol. 5, núm. 14 (1997), p. 459]
- DYCK, R.; BEAULIEU, C.; CYNADER, M. (1993). «Histochemical localization of synaptic zinc in the developing cat visual cortex». *J. Comp. Neurol.*, núm. 329, p. 53-67.
- EBADI, M.; PERINI, F.; MOUNTJOY, K.; GARVEY, J. S. (1996). «Amino acid composition, immunoreactivity, sequence analysis, and function of bovine hippocampal metallothionein isoforms». *J. Neurochem.*, núm. 66, p. 2121-2127.
- ESLER, W. P.; STIMSON, E. R.; JENNINGS, J. M.; GHILARDI, J. R.; MANTYH, P. W.; MAGGIO, J. E. (1996). «Zinc-induced aggregation of human and rat beta-amyloid peptides in vitro». *J. Neurochem.*, núm. 66, p. 723-732.
- FOSMIRE, G. J.; AL-UBAIDI, Y. Y.; SANDSTEAD, H. H. (1975). «Some effects of postnatal zinc deficiency on developing rat brain». *Pediatr. Res.*, núm. 9, p. 89-93.
- FRANCO-PONS, N.; CASANOVAS-AGUILAR, C.; ARROYO, S.; RUMIA, J.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; DANSCHER, G. (2000). «Zinc-rich synaptic boutons in human temporal cortex biopsies». *Neuroscience*, núm. 98, p. 429-435.
- FREDERICKSON, C. J.; BUSH, A. I. (2001). «Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects». *Biometals*, núm. 14, p. 353-366.
- FREDERICKSON, C. J.; DANSCHER, G. (1988). «Hippocampal zinc, the storage granule pool: Localization, physiochemistry, and possible functions». A: MORLEY, J. E.; STERMAN, M. B.; WALSH, J. H. [ed.]. *Nutritional modulation of brain function*. San Diego: Academic Press, p. 289-306.

- FREDERICKSON, C. J.; KASARSKIS, E. J.; RINGO, D.; FREDERICKSON, R. E. (1987a). «A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain». *J. Neurosci. Methods*, núm. 20, p. 91-103.
- FREDERICKSON, C. J.; KLITENICK, M. A.; MANTON, W. I.; KIRKPATRICK, J. B. (1983). «Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat». *Brain Res.*, núm. 273, p. 335-339.
- FREDERICKSON, C. J.; MANTON, W. I.; FREDERICKSON, M. H.; HOWELL, G. A.; MALLORY, M. A. (1982). «Stable-isotope dilution measurement of zinc and lead in rat hippocampus and spinal cord». *Brain Res.*, núm. 246, p. 338-341.
- FREDERICKSON, C. J.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; DANSCHER, G. (1987b). «Zinc-containing 7S-NGF complex. Evidence from zinc histochemistry for localization in salivary secretory granules». *J. Histochem. Cytochem.*, núm. 35, p. 579-583.
- FREDERICKSON, C. J.; SUH, S. W.; SILVA, D.; FREDERICKSON, C. J.; THOMPSON, R. B. (2000). «Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron». *J. Nutr.*, núm. 130 (5 supl.), p. 1471S-1483S.
- FRIEDMAN, B.; PRICE, J. L. (1984). «Fiber systems in the olfactory bulb and cortex: a study in adult and developing rats, using the timm method with the light and electron microscope». *J. Comp. Neurol.*, núm. 223, p. 88-109.
- GAITHER, L. A.; EIDE, D. J. (2001). «Eukaryotic zinc transporters and their regulation». *Bio-metals*, núm. 14, p. 251-270.
- GARRETT, B.; SØRENSEN, J. C.; SLOMIANKA, L. (1992). «Fluoro-Gold tracing of zinc-containing afferent connections in the mouse visual cortices». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 185, p. 451-459.
- GRAY, E. G. (1959). «Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: An electron-microscope study». *J. Anat.*, núm. 93, p. 420-433.
- HARRISON, N. L.; GIBBONS, S. J. (1994). «Zn<sup>2+</sup>: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels». *Neuropharmacology*, núm. 33, p. 935-952.
- HAUG, F.-M. S. (1967). «Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure». *Histochemie*, núm. 8, p. 355-368.
- (1973). «Heavy metals in the brain. A light microscope study of the rat with Timm's sulphide silver method. Methodological considerations and cytological and regional staining patterns». *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, núm. 47, p. 1-71.
- HESSE, G. W. (1979). «Chronic zinc deficiency alters neuronal function of hippocampal mossy fibers». *Science*, núm. 205, p. 1005-1007.
- HOWELL, G. A.; FREDERICKSON, C. J. (1990). «A retrograde transport method for mapping zinc-containing fiber systems in the brain». *Brain Res.*, núm. 515, p. 277-286.
- HOWELL, G. A.; WELCH, M. G.; FREDERICKSON, C. J. (1984). «Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices». *Nature*, núm. 308, p. 736-738.
- INTERNATIONAL ZINC ASSOCIATION. <<http://www.zinc.org>>
- JO, S. M.; DANSCHER, G.; SCHRÖDER, H. D.; WON, M. H.; COLE, T. B. (2000). «Zinc-enriched (ZEN) terminals in mouse spinal cord: immunohistochemistry and auto-metallography». *Brain Res.*, núm. 870, p. 163-169.
- KLITENICK, M. A.; FREDERICKSON, C. J.; MANTON, W. I. (1983). «Acid-vapor decomposi-

- tion for determination of zinc in brain tissue by isotope dilution mass spectrometry». *Anal. Chem.*, núm. 55, p. 921-923.
- KOH, J. Y.; SUH, S. W.; GWAG, B. J.; HE, Y. Y.; HSU, C. Y.; CHOI, D. W. (1996). «The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia». *Science*, núm. 272, p. 1013-1016.
- LARSON, A. A.; GIOVENGO, S. L.; SHI, Q.; VELAZQUEZ, R. A.; KOVÁCS, K. J. (2000). «Zinc in the extracellular area of the central nervous system is necessary for the development of kainic acid-induced persistent hyperalgesia in mice». *Pain*, núm. 86, p. 177-184.
- LEES, G. J.; CUAJUNCO, M. P.; LEONG, W. (1998). «Effect of metal chelating agents on the direct and seizure-related neuronal death induced by zinc and kainic acid». *Brain Res.*, núm. 799, p. 108-117.
- LÓPEZ-GARCÍA, C.; MOLOWNY, A.; PÉREZ-CLAUSELL, J. (1983). «Volumetric and densitometric study in the cerebral cortex and septum of a lizard (*Lacerta galloti*) using the Timm method». *Neurosci. Lett.*, núm. 40, p. 13-18.
- LOVELL, M. A.; XIE, C.; MARKESBERY, W. R. (1999). «Protection against amyloid beta peptide toxicity by zinc». *Brain Res.*, núm. 823, p. 88-95.
- MANTYH, P. W.; GHILARDI, J. R.; ROGERS, S.; DEMASTER, E.; ALLEN, C. J.; STIMSON, E. R.; MAGGIO, J. E. (1993). «Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide». *J. Neurochem.*, núm. 61, p. 1171-1174.
- MARTÍNEZ-GUIJARRO, F. J.; SORIANO, E.; RÍO, J. A. del; LÓPEZ-GARCÍA, C. (1991). «Zinc-positive boutons in the cerebral cortex of lizards show glutamate immunoreactivity». *J. Neurocytol.*, núm. 20, p. 834-843.
- MENGUAL, E.; CASANOVAS-ÁGUILAR, C.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; GIMENEZ-AMAYA, J. M. (2001). «Thalamic distribution of zinc-rich terminal fields and neurons of origin in the rat». *Neuroscience*, núm. 102, p. 863-884.
- (1995). «Heterogeneous and compartmental distribution of zinc in the striatum and globus pallidus of the rat». *Neuroscience*, núm. 66, p. 523-537.
- MULTHAUP, G.; BUSH, A. I.; POLLWEIN, P.; MASTERS, C. L. (1994). «Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP)». *FEBS Lett.*, núm. 355, p. 151-154.
- OLNEY, J. W.; DEGUBAREFF, T.; SLOVITER, R. S. (1983). «"Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. II. Ultrastructural analysis of acute hippocampal pathology». *Brain Res. Bull.*, núm. 10, p. 699-712.
- ONO, S.; CAI, L.; CHERIAN, M. G. (1998). «Effects of gamma radiation on levels of brain metallothionein and lipid peroxidation in transgenic mice». *Radiat. Res.*, núm. 150, p. 52-57.
- ONO, S.; CHERIAN, M. G. (1998). «Changes in brain metallothionein and zinc during development in transgenic mice». *Biol. Trace Elem. Res.*, núm. 61, p. 41-49.
- ONO, S.; KOROPATNICK, D. J.; CHERIAN, M. G. (1997). «Regional brain distribution of metallothionein, zinc and copper in toxic milk mutant and transgenic mice». *Toxicology*, núm. 124, p. 1-10.
- PALMITER, R. D.; COLE, T. B.; FINDLEY, S. D. (1996a). «ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration». *EMBO J.*, núm. 15, p. 1784-1791.

- PALMITER, R. D.; COLE, T. B.; QUAIFFE, C. J.; FINDLEY, S. D. (1996*b*). «ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 93, p. 14934-14939.
- PENKOWA, M.; GIRALT, M.; THOMSEN, P. S.; CARRASCO, J.; HIDALGO, J. (2001). «Zinc or copper deficiency-induced impaired inflammatory response to brain trauma may be caused by the concomitant metallothionein changes». *J. Neurotrauma*, núm. 18, p. 447-463.
- PENKOWA, M.; NIELSEN, H.; HIDALGO, J.; BERNTH, N.; MOOS, T. (1999). «Distribution of metallothionein-I plus Metallothionein-II and vesicular zinc in the developing central-nervous-system: Correlative study in the rat». *J. Comp. Neurol.*, núm. 412, p. 303-318.
- PENLAND, J. G. (2000). «Behavioral data and methodology issues in studies of zinc nutrition in humans». *J. Nutr.*, núm. 130 (5 supl.), p. 361S-364S.
- PÉREZ-CLAUSELL, J. (1988). «Organization of zinc-containing terminal fields in the brain of the lizard *Podarcis hispanica*: a histochemical study». *J. Comp. Neurol.*, núm. 267, p. 153-171.
- (1996). «Distribution of terminal fields stained for zinc in the neocortex of the rat». *J. Chem. Neuroanat.*, núm. 11, p. 99-111.
- PÉREZ-CLAUSELL, J.; DANSCHER, G. (1985). «Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study». *Brain Res.*, núm. 337, p. 91-98.
- PÉREZ-CLAUSELL, J.; FREDERICKSON, C. J.; DANSCHER, G. (1989). «Amygdaloid efferents through the stria terminalis in the rat give origin to zinc-containing boutons». *J. Comp. Neurol.*, núm. 290, p. 201-212.
- PETERS, S.; KOH, J.; CHOI, D. W. (1987). «Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons». *Science*, núm. 236, p. 589-593.
- PIÑUELA, C.; BAATRUP, E.; GENESER, F. A. (1992*a*) «Histochemical distribution of zinc in the brain of the rainbow trout, *Oncorhynchus myciss*. I: The telencephalon». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 185, p. 379-388.
- (1992*b*) «Histochemical distribution of zinc in the brain of the rainbow trout, *Oncorhynchus myciss*. II: The diencephalon». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 186, p. 275-284.
- RAMÓN Y CAJAL, S. (1889). «Nuevas aplicaciones del método de coloración de Golgi». *Gaceta Médica Catalana* (1 octubre).
- ROLFS, A.; HEDIGER, M. A. (1999). «Metal-ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications». *J. Physiol.* [London], núm. 518, p. 1-12.
- ROSSI, D. J.; OSHIMA, T.; ATTWELL, D. (2000). «Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake». *Nature*, núm. 403, p. 316-321.
- SAITO, T.; TAKAHASHI, K.; NAKAGAWA, N.; HOSOKAWA, T.; KURASAKI, M.; YAMANOSHITA, O.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, H.; NAGASHIMA, K.; FUJITA, H. (2000). «Deficiencies of hippocampal Zn and ZnT3 accelerate brain aging of Rat». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 279, p. 505-511.
- SÁNCHEZ-ANDRÉS, J. V.; PALOP, J. J.; RAMÍREZ, C.; NÁCHER, J.; MOLOWNY, A.; LÓPEZ-GARCÍA, C. (1997). «Zinc-positive presynaptic boutons of the rabbit hippocampus during early postnatal development». *Brain Res. Dev. Brain Res.*, núm. 103, p. 171-183.
- SANDSTEAD, H. H. (2000). «Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain». *J. Nutr.*, núm. 130 (5 supl.), p. 347S-349S.

- SCHRÖDER, H. D.; DANSCHER, G.; JO, S. M.; SU, H. (2000). «Zinc-enriched boutons in rat spinal cord». *Brain Res.*, núm. 868, p. 119-122.
- SENSI, S. L.; YIN, H. Z.; WEISS, J. H. (1999). «Glutamate triggers preferential Zn<sup>2+</sup> flux through Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA channels and consequent ROS production». *Neuro-Report*, núm. 10, p. 1723-1727.
- (2000). «AMPA/kainate receptor-triggered Zn<sup>2+</sup> entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn<sup>2+</sup> uptake and persistent mitochondrial dysfunction». *Eur. J. Neurosci.*, núm. 12, p. 3813-3818.
- SLOMIANKA, L.; DANSCHER, G.; FREDERICKSON, C. J. (1990). «Labeling of the neurons of origin of zinc-containing pathways by intraperitoneal injections of sodium selenite». *Neuroscience*, núm. 38, p. 843-854.
- SLOVITER, R. S. (1994). «The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy». *Ann. Neurol.*, núm. 35, p. 640-654.
- SMART, T. G.; XIE, X.; KRISHEK, B. J. (1994). «Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc». *Prog. Neurobiol.*, núm. 42, p. 393-441.
- SMEETS W. J.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; GENESER, F. A. (1989). «The distribution of zinc in the forebrain and midbrain of the lizard *Gekko gekko*. A histochemical study». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 180, p. 45-56.
- SØRENSEN, J. C.; SLOMIANKA, L.; CHRISTENSEN, J.; ZIMMER, J. (1995). «Zinc-containing telencephalic connections to the rat striatum: a combined Fluoro-Gold tracing and histochemical study». *Exp. Brain Res.*, núm. 105, p. 370-382.
- SØRENSEN, J. C.; TØNDER, N.; SLOMIANKA, L. (1993). «Zinc-positive afferents to the rat septum originate from distinct subpopulations of zinc-containing neurons in the hippocampal areas and layers. A combined fluoro-gold tracing and histochemical study». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 188, p. 107-115.
- SUH, S. W.; CHEN, J. W.; MOTAMED, M.; BELL, B.; LISTIAK, K.; PONS, N. F.; DANSCHER, G.; FREDERICKSON, C. J. (2000). «Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury». *Brain Res.*, núm. 852, p. 268-273.
- TAKEDA, A. (2000). «Movement of zinc and its functional significance in the brain». *Brain Res. Brain Res. Rev.*, núm. 34, p. 137-148.
- (2001). «Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain». *Biometals*, núm. 14, p. 343-351.
- TANAKA, D., Jr. (1987). «Differential laminar distribution of corticostriatal neurons in the prefrontal and pericruciate gyri of the dog». *J. Neurosci.*, núm. 7, p. 4095-4106.
- UNIVERSITAT TUFTS. <<http://nutrition.tufts.edu>>
- VAROQUI, H.; SCHAFER, M. K.; ZHU, H.; WEIHE, E.; ERICKSON, J. D. (2002). «Identification of the differentiation-associated Na<sup>+</sup>/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses». *J. Neurosci.*, núm. 22, p. 142-155.
- VELÁZQUEZ, R. A.; CAI, Y.; SHI, Q.; LARSON, A. A. (1999). «The distribution of zinc selenite and expression of metallothionein-III mRNA in the spinal cord and dorsal root ganglia of the rat suggest a role for zinc in sensory transmission». *J. Neurosci.*, núm. 19, p. 2288-2300.

- VOGT, K.; MELLOR, J.; TONG, G.; NICOLL, R. (2000). «The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses». *Neuron*, núm. 26, p. 187-196.
- WESTBROOK, G. L.; MAYER, M. L. (1987). «Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons». *Nature*, núm. 328, p. 640-643.
- XU, H.; MITCHELL, C. L. (1993). «Chelation of zinc by diethyldithiocarbamate facilitates bursting induced by mixed antidromic plus orthodromic activation of mossy fibers in hippocampal slices». *Brain Res.*, núm. 624, p. 162-170.
- YANAGITANI, S.; MIYAZAKI, H.; NAKAHASHI, Y.; KUNO, K.; UENO, Y.; MATSUSHITA, M.; NAITOH, Y.; TAKETANI, S.; INOUE, K. (1999). «Ischemia induces metallothionein III expression in neurons of rat brain». *Life Sci.*, núm. 64, p. 707-715.
- YANG, Y.; TANDON, P.; LIU, Z.; SARKISIAN, M. R.; STAFSTROM, C. E.; HOLMES, G. L. (1998). «Synaptic reorganization following kainic acid-induced seizures during development». *Brain Res. Dev. Brain Res.*, núm. 107, p. 169-177.

# LES NEUROTOXINES CLOSTRIDIALS COM A EINES MOLECULARS I TERAPÈUTIQUES

Joan Blasi, Mireia Martín-Satué, Ashraf Muhaisen,  
Adriana Raptis, Àlex Soler i Benjamín Torrejón-Escribano  
*Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica  
Universitat de Barcelona. Campus de Bellvitge*

## SUMMARY

Clostridial neurotoxins (tetanus toxin and botulinum neurotoxins) are the most lethal proteins known to human. They bind selectively to the nerve terminals where selectively inhibit the exocytosis of the synaptic vesicles and so block the neurotransmission. In addition to their lethal effect, clostridial neurotoxins have been used in therapeutical treatments. In particular, the botulinum neurotoxins (specially of type A) have been widely used in the treatment of neuromuscular alterations because of its ability to relax the muscles by blocking the secretion of the acetylcholine from the motor nerve terminals. The tetanus toxin, from the other side, principally blocks the secretion of the inhibitory neurotransmitters of the interneurons of the spinal cord. Consequently, it causes a spastic paralysis. Because of its ability to be transported retrogradely, tetanus toxin can be used as a vehicle to direct molecules with a potential therapeutical effect to the central nervous system.

From the other side, these toxins have become fundamental tools to understand the neurosecretion machinery and the regulated secretion in other cellular models as well as other fenomens in which exists the membrane fusion between the cellular compartments.

In this communication, we focus on properties of the clostridial neurotoxins to recognize and act specifically at the nerve terminations where they cleave particular synaptic proteins. Specially, the report is concentrated on the botulinum neurotoxins, which have been used as therapeutical agents.

## RESUM

Les neurotoxines clostridials (toxina tetànica i neurotoxines botulíniques) són les proteïnes més letals que es coneixen. S'uneixen selectivament als terminals nerviosos, on inhibeixen l'exocitosi de vesícules sinàptiques i, per tant, bloquegen la neurotransmissió. No obstant això, malgrat el seu efecte letal, les neurotoxines clostridials s'han utilitzat per a tractaments terapèutics. En particular, les neurotoxines botulíniques (sobretot la de tipus A) han estat àmpliament emprades per al tractament d'alteracions neuromusculars, per la seva habilitat de relaxar la musculatura en bloquejar la secreció d'acetilcolina dels terminals nerviosos motors. La toxina tetànica, per la seva banda, bloqueja principalment la secreció de neurotransmissors inhibidors de les interneurons de la medulla espinal. Conseqüentment, provoca una paràlisi espàstica. Gràcies a la seva propietat de ser transportada retrògradament, la toxina tetànica pot ser utilitzada com a vehicle per dirigir molècules amb un efecte potencialment terapèutic al sistema nerviós central.

D'altra banda, aquestes toxines han estat unes eines fonamentals per entendre la maquinària neurosecretora i, per extensió, la secreció regulada en altres models cel·lulars, així com altres fenòmens en els quals intervé la fusió de membranes entre compartiments cel·lulars.

En aquesta comunicació, ens centrarem en les propietats de les neurotoxines clostridials per reconèixer les terminacions nervioses i actuar-hi específicament, ja que és on proteolitzen determinades proteïnes sinàptiques. Farem esment especialment de les toxines botulíniques, ja que són les utilitzades com a agents terapèutics.

## INTRODUCCIÓ

La toxina tetànica i les neurotoxines botulíniques són les responsables del tètanus i el botulisme, que es manifesten en forma de paràlisi espàstica i flàccida respectivament. Malgrat la potència letal d'aquestes toxines, la seva incidència clínico-social és relativament baixa, ja que, d'una banda, existeix una vacuna altament efectiva (com en el cas de la toxina tetànica, el tètanus), i, de l'altra, les creixents mesures d'higiene i control en la conservació d'aliments afavoreixen la baixa freqüència de casos. No obstant això, per exemple, entre 1988 i 1998 s'ha enregistrat més d'un brot de botulisme a l'any a França, Alemanya, Espanya i Itàlia (amb un total de cent setanta-set casos a Alemanya, quatre-cents dotze a Itàlia i noranta-dos a Espanya en aquest període, vegeu: <http://www.eurosurveillance.org/em/v04n01/0401-322.asp?langue=03&>). Malgrat la baixa incidència d'aquesta afecció, el problema està en l'elevada mortalitat que provoca si no es detecta a temps.



A part d'aquestes consideracions, les neurotoxines clostridials, i en especial la toxina botulínica, han anat guanyant interès en els darrers anys per dos motius principals. Un és que han estat unes eines moleculars clau per esbrinar el mecanisme molecular de la neurosecreció. L'altre, de caire més aplicat, és la seva utilització com a molècules terapèutiques per a un nombre creixent d'afeccions, sobretot d'origen muscular (encara que no exclusivament, com és el cas d'aplicacions per hiperhidrosi i hipersalivació) o el seu ús en tractaments d'estètica.

## LES NEUROTOXINES CLOSTRIDIALS

Les neurotoxines clostridials (NTC) són proteïnes sintetitzades per bacteris anaeròbics productors d'espores del gènere *Clostridium*. Comprenen la toxina tetànica (TeTx), produïda per *Clostridium tetani*, i set tipus serològicament diferents de neurotoxines botulíniques (anomenades de la A a la G, BoNT/A a BoNT/G) produïdes bàsicament per soques de *Clostridium botulinum* (Hatheway, 1989). Representen el grup de neurotoxines de natura proteica més potents que hi ha. Es calcula que la dosi letal de la BoNT/A, la més potent, és al voltant de 0,4 i 1 ng per Kg en ratolins i humans, respectivament (Gill, 1982; Middlebrook, 1989; Schechter i Arnon, 2000).

Aquesta gran potència letal s'atribueix bàsicament a dos factors: l'elevada afinitat i especificitat de les neurotoxines per al teixit nerviós i la seva activitat proteolítica intracel·lular, que és la causant, en definitiva, de la seva activitat inhibidora de la neurosecreció.

La TeTx i les BoNT són responsables de les manifestacions clíniques del tètanus i el botulisme, respectivament. El tètanus es caracteritza per una paràlisi muscular espàstica, amb contracció de la musculatura voluntària, que pot provocar la mort per aturada respiratòria. La manifestació final del botulisme, en canvi, és la d'una paràlisi flàccida, amb impossibilitat de contracció muscular esquelètica, de manera que la causa de la mort és també l'aturada respiratòria. Malgrat que les manifestacions clíniques són diverses, el mecanisme cel·lular d'acció és, bàsicament, el mateix: la inhibició de la secreció del neurotransmissor als terminals nerviosos (Niemann *et al.*, 1994; Montecucco i Schiavo, 1995). Els dos tipus de neurotoxines s'uneixen específicament a receptors presents a la membrana presinàptica de les unions neuromusculars, però mentre que les BoNT bloquegen la secreció d'acetilcolina (ACh) de la mateixa unió neuromuscular i provoquen la paràlisi flàccida (Mellanby, 1984; Wellhoner, 1982), la TeTx és transportada retrògradament cap al cos de la motoneurona a la medul·la espinal (Schwab *et al.*, 1979), des d'on migra transsinàpticament cap a les interneurons inhibidores. És en aquestes on bloqueja la secreció de neurotransmissors inhibidors (GABA, glicina), que provoca la paràlisi espàstica (Bizzini, 1989; Montecucco i Schiavo, 1995).

Una altra de les diferències entre la TeTx i les BoNT és la via d'entrada a l'organisme. El tètanus s'esdevé habitualment per ferides en què el bacteri pot progressar en unes mínimes condicions anaeròbiques i produir la toxina.

La via habitual, encara que no totalment exclusiva, de les neurotoxines botulíniques és a través del consum d'aliments en mal estat de conservació on ha pogut créixer el bacteri en condicions anaeròbiques i produir la toxina. Les BoNT resisteixen el pas per l'estómac i són absorbides pels budells, des d'on es distribueixen pel cos. Les BoNT poden resistir el suc gàstric de l'estómac, ja que són produïdes juntament amb altres proteïnes no neurotòxiques que les envolten tot formant un complex proteic d'elevat pes molecular (Sugiyama, 1980) de fins a 900 kDa en el cas de la BoNT/A. Aquests complexos es coneixen com a *toxines botulíniques*. Algunes de les proteïnes que acompanyen la neurotoxina i formen el complex tenen activitat hemaglutinant i d'altres no. Cap d'aquestes proteïnes, però, intervé en el procés neurotòxic en si. Fora de l'ambient àcid de l'estómac, un cop als budells, el complex es disgrega i la neurotoxina és absorbida. Encara no es coneix amb detall el mecanisme pel qual la neurotoxina travessa l'epiteli intestinal; un dels més acceptats és el de l'endocitosi seguida del pas a través de la cèl·lula epitelial absorbiva (l'enteròcit) des del pol apical fins al basolateral (transcitosi) (Maksymowych i Simpson, 1998; Maksymowych *et al.*, 1999).

A més de la intoxicació per consum d'aliments en mal estat de conservació, s'han descrit altres casos de botulisme amb diferents vies d'entrada del bacteri o la seva toxina a l'organisme. El botulisme infantil s'esdevé per l'entrada d'espores i el subseqüent creixement del clostridi al budell d'infants molt petits (Midura i Arnon, 1976; Pickett *et al.*, 1976; Midura, 1996) quan encara no el tenen colonitzat per altres bacteris. És el tipus de botulisme més corrent actualment als Estats Units, on es fa un seguiment més exhaustiu (possiblement per això se'n descriuen més casos, especialment a Califòrnia, on s'ha estudiat més). S'ha assenyalat que la mel que a vegades es dona als nadons en pot ser una de les causes, ja que pot contenir espores del clostridi (Arnon *et al.*, 1979). No obstant això, en els últims anys, menys del 5 % del botulisme infantil referenciat a Califòrnia s'ha pogut atribuir al consum de mel (Midura, 1996). Encara que el clostridi no creix als budells de persones adultes ja que ha de competir amb la flora bacteriana natural, s'ha descrit algun cas de botulisme per invasió d'espores als budells de persones adultes amb afeccions intestinals (McCroskey i Hatheway, 1988; Cherington, 1988).

Un tipus més rar de botulisme és el degut a ferides. Es pot considerar en aquells casos aïllats en què es presenten els símptomes de botulisme en una persona que ha patit alguna ferida d'on es pot aïllar el bacteri, i sense evidència d'intoxicació per menjar (Weber *et al.*, 1993). En aquest tipus de botulisme s'inclouen els associats al consum de drogues. Un d'aquests casos ha estat el botulisme que va aparèixer en persones que consumien una heroïna importada de Mèxic (*Mexican black*

*tar*) que contenia espores del clostridi (Merson i Dowell, 1973). Altres casos relacionats són els descrits en persones amb símptomes de botulisme i que eren consumidores de cocaïna. Aquestes persones presentaven inflamació de la mucosa nasal, on es va detectar el bacteri (Kudrow *et al.*, 1988).

Hi ha un darrer tipus de possible entrada a l'organisme de la toxina botulínica, però que no es considera natural, i és per inhalació de toxina en forma d'aerosol. Aquesta via s'ha demostrat experimentalment en primats (Franz *et al.*, 1993), i s'ha intentat utilitzar en atemptats de bioterrorisme, encara que sense conseqüències (Arnon *et al.*, 2001). S'ha provat la possibilitat d'utilitzar la propietat de la toxina botulínica de tipus A de ser absorbida per inhalació per fabricar vacunes amb aplicació intranasal fetes a base de toxina botulínica detoxificada (Park i Simpson, 2003; vegeu també <http://news.cnet.com/investor/news/newsitem/0-9900-1028-20927919-0.html>).

En el cas del botulisme, el grau de gravetat pot ser variable i dependrà de la quantitat de toxina absorbida per l'organisme. Els símptomes més lleus inclouen debilitat muscular, dificultat en la parla o en empassar, i visió doble i borrosa, que pot continuar amb debilitat progressiva i acabar en paràlisi. La recuperació s'esdevé per la nova formació de terminals nerviosos que reinnervaran els músculs paralitzats, en un procés que pot durar setmanes o mesos. En els casos greus i si s'agafa a temps, es manté la persona intoxicada amb ventilació assistida fins a la seva recuperació.

També s'ha observat que la sensibilitat a les toxines botulíniques depèn del tipus de toxina (A-G) i que una mateixa toxina presenta diferències entre espècies animals. En l'espècie humana s'han detectat casos de botulisme deguts a la toxina botulínica de tipus A (la més potent de totes), B, E i algun cas a la de tipus F. Pel que fa a les toxines botulíniques de tipus C i D, no se n'ha detectat cap cas clar en humans, però sí, en canvi, en animals. La de tipus C és la principal responsable de brots de botulisme en aus. No obstant això, s'ha vist que la toxina botulínica de tipus C és activa en humans (Eleopra *et al.*, 1997) i fins i tot s'ha detectat un cas aïllat de botulisme infantil provocat per aquesta toxina (Oguma *et al.*, 1990). La soca que produeix la BoNT/G es va aïllar del terra de Sud-amèrica sense que fins al moment s'hagi detectat cap cas de botulisme per causa natural (Hatheway, 1989; Arnon *et al.*, 2001).

A part de les diferències mencionades més amunt, totes les neurotoxines clostridials (NTC) presenten una estructura molecular semblant i bloquegen la secreció del neurotransmissor mitjançant una activitat proteolítica específica dependent de zinc sobre proteïnes SNARE presents a les terminacions nervioses. S'ha demostrat que aquestes proteïnes són essencials per a l'exocitosi de vesícules sinàptiques, tal com veurem més endavant.

## ESTRUCTURA MOLECULAR

El model d'acció de les NTC està molt relacionat amb la seva estructura molecular. Les NTC se sintetitzen en forma inactiva com una proteïna de cadena única d'uns 150 kDa. La forma activa es genera després d'una proteòlisi específica, aproximadament a un terç de la seva longitud des de l'extrem amínic, de manera que s'obtenen dues cadenes, una d'aproximadament 100 kDa, anomenada *cadena pesada* (*heavy chain* o HC) i l'altra d'aproximadament 50 kDa, que es coneix com a *cadena lleugera* (*light chain* o LC).

La proteasa responsable de l'activació de la neurotoxina la pot produir el mateix bacteri (com en el cas de la TeTx, la BoNT/A o la BoNT/B), que ja sintetitza la neurotoxina activa, o pot no ser així, com en el cas de la BoNT/E, en què l'activació es realitza durant el pas pel tub digestiu (DasGupta, 1989). Les dues cadenes es mantenen unides per un únic pont disulfur (figura 1), que si es redueix provoca la separació de les dues cadenes i la consegüent inactivació de les neurotoxines.

Alhora, la cadena pesada està formada per dos dominis ben diferenciats i de pes molecular semblant, que es poden separar amb papaïna, i que tenen un significat funcional diferent en el mecanisme d'acció de les neurotoxines.

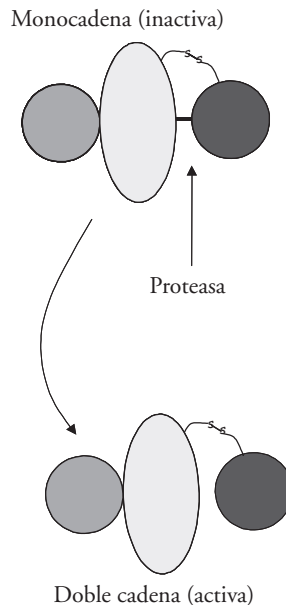


FIGURA 1. Esquema de l'estructura general de les neurotoxines clostridials.

Així doncs, l'estructura terciària de les NTC està formada per tres dominis diferents, cada un d'aproximadament 50 kDa: l'extrem carboxílic de la cadena pesada (Hc), l'extrem amínic de la mateixa cadena (Hn) i la cadena lleugera. Cada domini és responsable d'un pas en el camí que segueixen les neurotoxines per a la intoxicació dels terminals nerviosos.

En la seva seqüència d'acció, les neurotoxines segueixen inicialment un patró que comparteixen amb les toxines anomenades *de tipus AB*. La toxina colèrica, diftèrica i *Ricinus*, a més de les clostridials, en són una mostra (Rappuoli i Montecucco, 1997). Aquest tipus de toxines estan formades per dos dominis diferenciats, un domini (el B) s'encarrega de la unió selectiva i l'entrada a l'interior de la cèl·lula, i l'altre domini (l'A) és responsable de l'acció tòxica, habitualment a través d'una activitat enzimàtica.

En el cas de les NTC es diferencien, com s'ha dit anteriorment, fins a tres dominis, de manera que el pas d'unió i entrada a l'interior de la cèl·lula es considera per separat del d'entrada al citosol o translocació.

Així, en el primer pas de la intoxicació, les neurotoxines s'uneixen a la membrana presinàptica del terminal nerviós de la motoneurona; en el segon, són internalitzades pel mecanisme d'endocitosi per mitjà de receptor; en el tercer, l'acidificació de l'endosoma promou la formació d'un porus i la translocació del domini catalític (cadena lleugera) al citosol, on tindrà accés a la proteïna SNARE per procedir al quart i definitiu pas, la seva proteòlisi i la inhibició de la secreció (Niemann *et al.*, 1994; Montecucco i Schiavo, 1995; Pellizzari *et al.*, 1999; Singh, 2000) (figura 2).

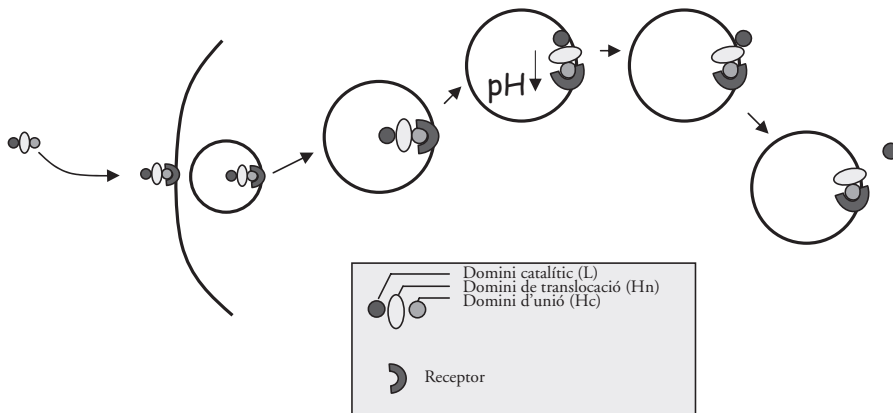


FIGURA 2. Esquema dels passos que segueixen les neurotoxines clostridials en la intoxicació de les terminacions nervioses: unió a la membrana presinàptica, internalització per endocitosi i translocació al citosol de la cadena lleugera.

L'estructura tridimensional de la BoNT/A va ser la primera a ser descrita a una elevada resolució (Lacy *et al.*, 1998). Altres neurotoxines o part d'aquestes han estat també resoltes (Umland *et al.*, 1998; Swaminathan i Eswaramoorthy, 2000; Hanson i Stevens, 2000; Emsley *et al.*, 2000; Fotinou *et al.*, 2001), de manera que s'observa una elevada semblança entre les unes i les altres. Es pot considerar, doncs, la BoNT/A com a model de l'estructura general per a la resta de les NTC.

#### DOMINI D'UNIÓ (Hc)

El fragment Hc de les NTC és el responsable del reconeixement i unió de les neurotoxines a les terminacions nervioses (Niemann *et al.*, 1994; Montecucco i Schiavo, 1995; Pellizzari *et al.*, 1999; Lalli *et al.*, 1999). El domini d'unió consisteix en dos subdominis, formats predominantment per làmines- $\beta$  i connectats per una hèlix- $\alpha$  prominent. El domini d'unió s'allunya del llarg eix helicoidal del domini de translocació, sense que es produeixi contacte directe entre els dominis carboxílic i de translocació. Aquesta és l'estructura comuna a totes les NTC, amb algunes diferències en les nanses exteriors (Lacy *et al.*, 1998; Lacy i Stevens, 1999). Comparant els dominis d'unió de la TeTx i la BoNT/A, es pot trobar més homologia entre les seqüències dels subdominis N-terminal que entre les dels C-terminal (Lacy *et al.*, 1998; Lacy i Stevens, 1999). Aquestes diferències en les seqüències d'aminoàcids entre les neurotoxines podrien ser les responsables de les diferències observades en la unió i el transport que s'han trobat, principalment entre les BoNT i la TeTx (Lacy i Stevens, 1999; Ginalska *et al.*, 2000).

Es pensa que la unió de les neurotoxines clostridials a la membrana presinàptica es pot realitzar per un model de «doble receptor», en què intervien polisialogangliòsids i un receptor proteic que encara no s'ha identificat. En aquest model, les NTC reconeixrien un polisialogangliòsid present a la membrana presinàptica i s'hi unirien inicialment amb baixa afinitat. Després, es mourien lateralment per la membrana fins a trobar un receptor proteic de més alta afinitat, que seria responsable de la seva internalització per endocitosi (Montecucco, 1986).

La regió responsable de la unió a gangliòsids ha estat localitzada en els trenta residus de l'extrem carboxílic a la BoNT/A (Shone *et al.*, 1985), a la TeTx (Shapiro *et al.*, 1997) i a la BoNT/E (Kubota *et al.*, 1997). També l'extrem més carboxílic és el responsable de la unió de la TeTx a una proteïna de baix pes molecular (15kDa, identificada com a proteïna Thy-1, que es troba a *lipid rafts*) present a línies cel·lulars neuronals i motoneurons (Herrerros *et al.*, 2000, 2001).

Fins ara no s'ha pogut aïllar el receptor proteic funcional per a les diferents neurotoxines, encara que han sorgit alguns candidats (vegeu la taula 1). En canvi, ha quedat ben establerta la unió selectiva de les neurotoxines a diferents tipus de

gangliòsids (Ahnert-Hilger i Bigalke, 1995; Bullens *et al.*, 2002). La identificació dels receptors proteics de les neurotoxines ha estat i és un tema molt estudiat, ja que es consideren molècules específiques presents a la membrana presinàptica que representen vies d'entrada als terminals nerviosos i fins i tot al sistema nerviós central en el cas de la TeTx (Lalli i Schiaro, 2002).

A continuació es presenta una taula on s'indiquen algunes de les troballes més significatives sobre la caracterització dels receptors de les NTC.

TAULA 1. *Caracterització bioquímica dels llocs d'unió de les neurotoxines clostridials*

<i>Toxina</i>	<i>Molècula on s'uneix</i>	<i>Referències</i>
TeTx	Gangliòsids i proteïna	Yavin <i>et al.</i> , 1981 Yavin <i>et al.</i> , 1983 Parton <i>et al.</i> , 1988 Lazarovi i Yavin, 1986
TeTx	Gangliòsids (GD1b i GT1b)	Critchley <i>et al.</i> , 1986 Rogers i Snyder, 1981
TeTx	Proteïna de 20 kDa	Schiavo <i>et al.</i> , 1991
Fragment Hc, TeTx	Thy-1 (proteïna) i gangliòsids	Herreros <i>et al.</i> , 2000 Herreros <i>et al.</i> , 2001
TeTx, BoNT/A, B i E	Gangliòsids (GT1b)	Schengrund <i>et al.</i> , 1991
BoN/TA	Gangliòsids (GT1b)	Kitamura <i>et al.</i> , 1980
BoNT/A	Proteïna de 140 kDa	Blasi <i>et al.</i> , 1992
BoNT/A i E	Sinaptotagmina I	Li i Singh, 1998
BoNT/B	Gangliòsids (GD1a o GT1b) Sinaptotagmina	Nishiki <i>et al.</i> , 1994 Nishiki <i>et al.</i> , 1996 Kozaki <i>et al.</i> , 1998
BoNT/B	Gangliòsids (estructura tridimensional)	Hanson i Stevens, 2000
BoNT/B, C1 i F	Gangliòsids (GD1a, GD1b i GT1b)	Ochanda <i>et al.</i> , 1986
BoNT/C1	Gangliòsid (GT1b) i possible proteïna	Agui <i>et al.</i> , 1985

## DOMINI DE TRANSLOCACIÓ (FRAGMENT HN)

Després de l'endocitosi, s'ha suggerit que el pH àcid de l'endosoma provoca un canvi conformacional del domini de translocació, el qual formaria un porus o canal a la membrana. Amb aquest canvi es provocaria la translocació de la cadena lleugera o domini catalític al citosol a través del canal format pel domini N-terminal de la cadena pesada (Hn).

El domini de translocació té dues hèlixs  $\alpha$  i un cinturó o banda de cinquanta-quatre residus que envolta el domini catalític. En aquest cas, manté ocult i inaccessible el lloc catalític de la cadena lleugera per al substrat (la proteïna SNARE diana) i per tant es fa necessària la separació del domini de translocació del catalític perquè aquest sigui funcional (Lacy *et al.*, 1998; Lacy i Stevens, 1999). Aquest és el cas de la BoNT/A, però en altres neurotoxines botulíniques en què aquesta banda no emmascara el domini catalític, la separació dels fragments no seria necessària per a l'activitat proteolítica de la cadena lleugera (Swaminathan i Eswaramoorthy, 2000).

Hi ha evidència experimental que el domini de translocació forma canals en membranes artificials (Blaustein *et al.*, 1987; Donovan i Middlebrook, 1986; Hoch *et al.*, 1985) i en membranes cel·lulars (Sheridan, 1998) sempre que es trobi en un ambient àcid separat d'un de neutre per la membrana. Recentment s'ha comparat el mecanisme de translocació de la cadena lleugera amb el dels canals conductors/translocadors del reticle endoplasmàtic, mitocondris i cloroplasts (Koriazova i Montal, 2003).

## DOMINI CATALÍTIC (CADENA L)

Durant molt de temps es va intentar esbrinar el mecanisme que utilitzaven les neurotoxines clostridials per inhibir, de manera tan potent i selectiva, la secreció del neurotransmissor. Durant molts anys es van realitzar una sèrie d'estudis que, encara que en general no van donar resultats positius, van deixar clar que les neurotoxines actuaven directament en el mecanisme molecular de la secreció, és a dir, sobre l'exocitosi en si de les vesícules sinàptiques. Així, es va demostrar que les neurotoxines no intervenien en la captació de neurotransmissors o els seus precursors, ni en la seva síntesi ni emmagatzemament a les vesícules, i que tampoc no interferien en el potencial d'acció o en el de membrana, ni en cap canal iònic dels que es van estudiar. Tampoc no afectaven la integritat del terminal nerviós, ni la seva activitat semblava que provoqués la mort neuronal, ni presentaven una activitat enzimàtica semblant a les descrites per altres toxines, com la ribosilació d'ADP (Simpson, 1989; Dreyer, 1989). No es va tenir una pista concreta sobre el mecanisme molecular d'acció de les cadenes lleugeres fins que es va descobrir que contenien una se-



qüència comuna a les metal·loproteases dependents de zinc (Jongeneel *et al.*, 1989; Kurazono *et al.*, 1992). A partir de llavors es va demostrar que la cadena lleugera unia ions de zinc i que aquests eren essencials per a la seva funció inhibidora de la neurotransmissió (Schiavo *et al.*, 1992a; Rossetto *et al.*, 1995). Poc després es va demostrar la seva activitat proteolítica i es van identificar els seus substrats.

TAULA 2. *Relació de les neurotoxines clostridials i els seus substrats moleculars*

<i>Neurotoxina</i>	<i>Substrat</i>	<i>Posició del tall</i>	<i>Referències</i>
TeTx	Sinaptobrevina/VAMP 2 Cel·lubrevina	Q <sup>76</sup> F <sup>77</sup>	Schiavo <i>et al.</i> , 1992b McMahon <i>et al.</i> , 1993
BoNT/A	SNAP-25	Q <sup>197</sup> R <sup>198</sup>	Blasi <i>et al.</i> , 1993a
BoNT/B	Sinaptobrevina/VAMP 2	Q <sup>76</sup> F <sup>77</sup>	Schiavo <i>et al.</i> , 1992b
BoNT/C1	Sintaxina-1A Sintaxina-1B SNAP-25	L <sup>253</sup> A <sup>254</sup> L <sup>252</sup> A <sup>253</sup> R <sup>198</sup> A <sup>199</sup>	Blasi <i>et al.</i> , 1993b Schiavo <i>et al.</i> , 1995 Williamson <i>et al.</i> , 1996
BoNT/D	Sinaptobrevina/VAMP 2 Cel·lubrevina	K <sup>59</sup> L <sup>60</sup>	Yamasaki <i>et al.</i> , 1994a
BoNT/E	SNAP-25	R <sup>180</sup> I <sup>181</sup>	Binz <i>et al.</i> , 1994
BoNT/F	Sinaptobrevina/VAMP 1 i 2 Cel·lubrevina	Q <sup>58</sup> K <sup>59</sup>	Schiavo <i>et al.</i> , 1993 Yamasaki <i>et al.</i> , 1994a
BoNT/G	Sinaptobrevina/VAMP 1 i 2 Cel·lubrevina	A <sup>81</sup> A <sup>82</sup>	Schiavo <i>et al.</i> , 1994 Yamasaki <i>et al.</i> , 1994b

L'activitat proteàsica de les neurotoxines és molt específica. Cadascuna efectua un únic tall proteolític sobre una única proteïna (exceptuant la BoNT/C1, que actua sobre dues). Tal com mostra la taula 2, els substrats de les neurotoxines tan sols són tres proteïnes (la Sinaptobrevina/VAMP, la SNAP-25 i la Sintaxina), de manera que una mateixa proteïna és el substrat de més d'una neurotoxina encara que, exceptuant la TeTx i la BoNT/B, el lloc de tall sigui diferent.

Tal com s'ha esmentat, l'acció inhibidora de les neurotoxines clostridials sobre la secreció del neurotransmissor és molt específica, sensible i potent, i es realitza directament sobre la maquinària neurosecretora, responsable de la fusió de les vesícules sinàptiques amb la membrana plasmàtica. Així doncs, els substrats de les neurotoxines clostridials es van definir com a components de la maquinària neurosecretora que eren essencials per a la neurosecreció.

El mateix any en què es va descobrir el primer substrat de les neurotoxines (la

Sinaptobrevina/VAMP per a la TeTx i la BoNT/B) es van descriure una sèrie de proteïnes que formen el nucli del mecanisme de fusió de membranes. Aquestes proteïnes es van anomenar *SNARE* («receptors de SNAP») i curiosament es va veure que eren les mateixes que els substrats de les neurotoxines.

#### ELS SUBSTRATS DE LES NEUROTOXINES CLOSTRIDIALS I LA MAQUINÀRIA NEUROSECRETORA

La fusió de la vesícula sinàptica amb la membrana presinàptica representa el punt culminant en la neurosecreció: la sortida del neurotransmissor cap a l'element postsinàptic, on es troba el seu receptor.

En els darrers anys s'han anat definint els elements que formen la maquinària neurosecretora, aquella que intervé en la fusió regulada per calci de les vesícules sinàptiques amb la membrana presinàptica. Els substrats de les neurotoxines clostridials, les proteïnes *SNARE*, han esdevingut el centre al voltant del qual s'han anat perfilant la resta d'elements d'aquesta maquinària, ja que estan directament involucrades en la fusió de les membranes vesicular i plasmàtica. Són considerades com a catalitzadores del fenomen de fusió de membranes ja que, de manera seqüencial, recluten un seguit de proteïnes, en gran part citosòliques, que regulen el procés de fusió (Jahn *et al.*, 2003).

Rothman i els seus col·laboradors van descriure una sèrie de factors citosòlics que eren essencials per al trànsit i la fusió de compartiments intracel·lulars (Wilson *et al.*, 1992; Rothman, 1994, 1996). Aquests elements eren l'NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*, una proteïna amb activitat ATPàsica) i les proteïnes SNAP ( $\alpha$ - i  $\gamma$ -, *soluble NSF attachment proteins*), que s'unien al primer. Segons la seva hipòtesi, dos compartiments de membrana cel·lulars, el donador i l'acceptor, es reconeixen per unió específica de proteïnes que tenen a la seva superfície. Després de la seva unió, el complex que es forma recluta els factors citosòlics SNAP i NSF, situació que provoca l'hidròlisi d'ATP per l'NSF, i causa la fusió dels dos compartiments (figura 3). Mitjançant una columna d'afinitat que contenia NSF i SNAP, van poder aïllar les proteïnes dels compartiments de membrana a partir d'un extracte de cervell de bou (Söllner *et al.*, 1993). Les proteïnes eren la Sinaptobrevina/VAMP, la SNAP-25 (*synaptosomal associated protein of 25 kDa*) i la Sintaxina-1 (A i B), a les quals van anomenar *SNARE*, perquè es comportaven com a proteïnes receptores del factor citosòlic SNAP (*SNAP-receptors*). Com que la Sinaptobrevina és una proteïna de la membrana de la vesícula sinàptica, considerada com a compartiment donador, es va definir com a v-SNARE.

La SNAP-25 i la Sintaxina-1, en estar en el compartiment acceptor (*target*), es van definir com a t-SNARE. A partir d'aquests descobriments es va perfilar la hipòtesi inicial *SNARE* per explicar el mecanisme de fusió (figura 3). Des de la primera

descripció, s'han anat trobant proteïnes SNARE en pràcticament tots els fenòmens de trànsit intracel·lular de membranes, de manera que les proteïnes SNARE formen una superfamília de més de trenta-cinc membres en cèl·lules de mamífer (Chen i Scheller, 2001; Bock *et al.*, 2001). Per tant, les proteïnes SNARE no estan només involucrades en la secreció regulada del neurotransmissor, sinó també en la majoria dels processos de fusió de compartiments intracel·lulars. Dintre de la superfamília, hi ha la tendència, basant-se en homologies entre els diferents membres, a catalogar-les en la família de la Sinaptobrevina/VAMP, de la SNAP-25 i de la Syntaxina, ja que les proteïnes SNARE que es van descriure originalment són les més ben caracteritzades i les que s'han anat utilitzant com a model.

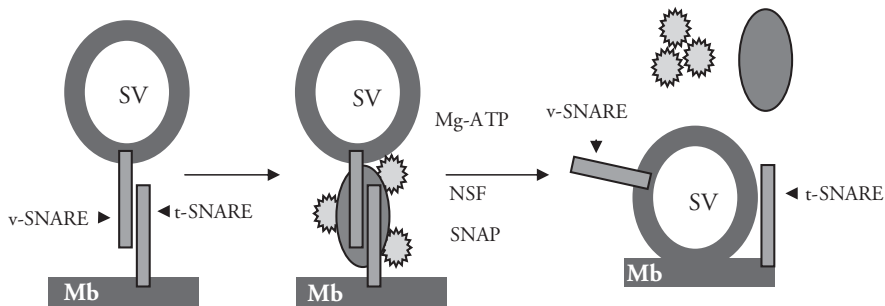


FIGURA 3. Esquema que mostra la hipòtesi SNARE que es va proposar inicialment.

En l'esquema inicial les proteïnes SNARE eren responsables del reconeixement i la unió dels dos compartiments, i formaven un complex per associació antiparal·lela. La seva dissociació per acció de l'NSF promouria la fusió de membranes. No obstant això, aquest esquema ha variat molt des de la resolució de l'estructura tridimensional del nucli del complex SNARE (Jahn *et al.*, 2003).

L'estructura tridimensional la van resoldre l'any 1998 els grups de Reinhard Jahn i Axel Brunger (Sutton *et al.*, 1998). De l'estructura es van extreure una sèrie de conclusions:

- El complex està format per quatre segments: un de Sinaptobrevina/VAMP, un altre de Syntaxina-1, i els altres dos de SNAP-25.
- Els segments es disposen en sentit paral·lel, és a dir, amb els extrems N-terminal en un mateix costat i els C-terminals a l'altre, en una estructura helicoidal. Quan cada SNARE es troba en el seu compartiment es forma un complex de tipus *trans*-. Després de la fusió, totes les proteïnes SNARE estan en la mateixa membrana fent un complex de tipus *cis*-.

- El nucli del complex és molt estable i resistent a detergents denaturants com l'SDS.
- El complex es forma pels extrems amínics, amb un moviment cremallera cap a l'extrem carboxílic. D'aquesta manera, les membranes dels dos compartiments es van apropant fins al punt de poder-se fusionar en el cas que no existeixi cap mecanisme de control (Weber *et al.*, 1998).

Poc després es va proposar que l'acció disgregadora de l'NSF (amb SNAP) es realitzés sobre el complex *cis-*, després de la fusió de membranes, per tal d'alliberar els respectius components del complex SNARE i que poguessin tornar a ser utilitzats en un altre cicle de fusió (Jahn *et al.*, 2003).

## EL CICLE VESICULAR I LA FORMACIÓ DEL COMPLEX SNARE

Les vesícules sinàptiques són produïdes en el cos neuronal i posteriorment transportades al terminal nerviós on, després d'una primera fusió amb la membrana presinàptica, entren en un cicle de reutilització, de manera que una vesícula sinàptica pot intervenir en la secreció del neurotransmissor diverses vegades (Sudhof, 1995). La fusió de les vesícules sinàptiques amb la membrana plasmàtica, base de la neurosecreció, és un pas més d'aquest cicle. L'any 1995, Thomas Südhof va esquematitzar els diferents passos que segueixen les vesícules sinàptiques en el seu cicle, agafant com a punt de partida la nova formació de la vesícula a partir d'un compartiment endosomal (Sudhof, 1995). Malgrat algunes modificacions, aquest esquema encara és vigent i ha servit de model per estudiar cada un dels passos que formen el cicle vesicular.

L'esquema adjunt (figura 4) representa una modificació de l'original on es resalten els passos previs a la fusió de la vesícula sinàptica. De l'esquema inicial es desprèn que hi ha una població de vesícules adherida físicament a la membrana plasmàtica i una altra d'allunyada o, si més no, en un segon pla, parcialment o totalment associada al citoesquelet del terminal nerviós.

De les vesícules que estan físicament en contacte amb la membrana plasmàtica, no totes estan preparades per a l'exocitosi immediata, de manera que es pot parlar d'una diversitat funcional de vesícules adherides a la membrana plasmàtica. Aquelles que estan llestes per a la secreció formen el grup preparat per a la secreció (RRP, de l'anglès *release-ready pool*). S'entén que aquestes vesícules tenen el complex SNARE totalment format i preparat per al pas final de la fusió, però que hi ha algun mecanisme que probablement actua com a sensor del calci intern i que el manté aturat (Xu *et al.*, 1998; Martin, 2002; Chapman, 2002). Per tant, ja que la formació del complex SNARE és necessària i suficient per a la fusió de membranes, els passos previs a l'exocitosi estan destinats a la regulació i correcta formació d'aquest complex.

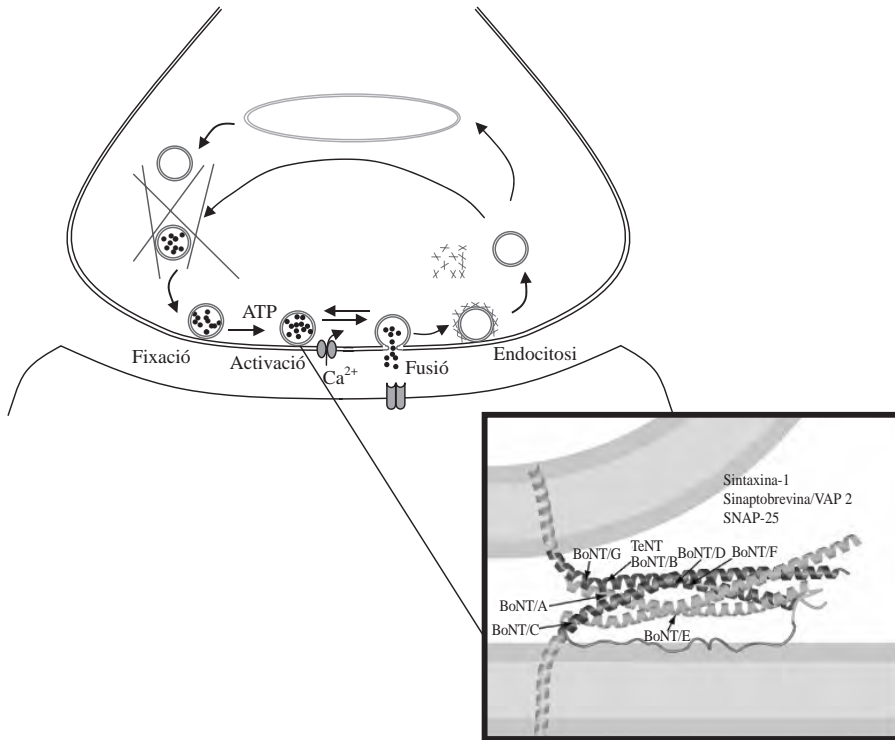


FIGURA 4. Representació esquemàtica del cicle vesicular en la terminació nerviosa i detall del complex SNARE.

Font: Sutton *et al.* (1998), *Nature*, núm. 395, p. 347-353.

Aquests passos previs són la fixació de la vesícula carregada amb el neurotransmissor a la membrana presinàptica (*docking*) i la seva preactivació (*priming*), que fa que la vesícula es torni competent per a la seva fusió, i formi part del grup de vesícules llestes per a la secreció. El temps que passa des de l'entrada de calci a l'interior del terminal, per l'obertura dels canals dependents de voltatge, fins a la fusió de les vesícules sinàptiques, es considera que és massa curt per realitzar tots els passos previs a la fusió, de manera que la vesícula sinàptica ja ha d'estar preparada en el moment precís de l'estímul (Almers i Tse 1990; Bruns i Jahn, 1995; Neher, 1998).

Des de fa anys s'han invertit grans esforços a assignar les proteïnes presents als terminals nerviosos a cada un dels passos del cicle vesicular. Existeixen excel·lents revisions sobre el tema on el lector interessat pot adreçar-se (Augustine *et al.*, 1999; Jahn i Südhof, 1999; Brunger, 2001; Martin, 2002; Jahn *et al.*, 2003).

Darrerament, s'ha centrat especial atenció en els dos passos previs a la fusió, aquells que regulen el volum de vesícules llestes per a la secreció.

El plantejament general és que les proteïnes SNARE estan involucrades en un cicle de formació i segregació del complex que segueix el de fusió vesicular (Jahn *et al.*, 2002). En aquest cicle intervenen, a més de les proteïnes SNARE, proteïnes moduladores del procés, algunes de les quals s'han anat identificant com a segrestadores de les proteïnes SNARE, que eviten la formació del complex. Entre aquestes s'ha descrit la Sinaptofisina per a la Sinaptobrevina (Calakos i Scheller, 1994; Edelman *et al.*, 1995) i la Sec1/Munc18 per a la Sintaxina (Pevsner *et al.*, 1994; Dulubova *et al.*, 1999).

La Sintaxina sembla que té un paper clau en la modulació de la formació del complex SNARE. Es pot replegar sobre si mateixa, en la forma que s'anomena *tancada* i que no pot formar complexos, o bé es pot trobar en la forma *oberta*, desplegada, capaç de formar complexos SNARE. La Sec1/Munc18 s'uneix a la Sintaxina i la manté en la seva forma tancada, de manera que impedeix la seva interacció amb la SNAP-25 i la Sinaptobrevina/VAMP. La unió de la Sec1/Munc18 amb la Sintaxina ha estat especialment estudiada i (en resum) s'ha descrit que:

- la Sec1/Munc18 interacciona amb la Sintaxina-1 i forma un complex heterodimèric del qual s'ha determinat l'estructura tridimensional (Misura *et al.*, 2000),
- la unió de la Munc18 amb la Sintaxina inhibeix la interacció d'aquesta amb la Sinaptobrevina i la SNAP-25, de manera que es bloqueja la formació de complexos SNARE (Perez-Branguli *et al.*, 2002),
- els ratolins mutants deficients per a aquesta proteïna tenen abolida la secreció de neurotransmissor, tant l'evocada com l'espontània, de manera que aquesta proteïna és essencial per al procés de secreció (Verhage *et al.*, 2000),
- La Munc18 està implicada en el pas de fixació de les vesícules secretores a la membrana plasmàtica (Voets *et al.*, 2001).

Hi ha altres proteïnes que intervenen en l'activació de les vesícules sinàptiques (*priming*, o pas previ a la fusió de membranes), que són capaces de desplaçar la Sec1/Munc18 de la seva unió amb la Sintaxina-1 i així permetre (i fomentar) la formació del complex SNARE. Entre aquestes s'han descrit la Tomosina, la Munc13, i la RIM (Fujita *et al.*, 1998; Brose *et al.*, 2000; Martin, 2002; Rizo i Sudhof, 2002).

## LA UTILITZACIÓ DE LA TOXINA BOTULÍNICA COM A EINA TERAPÈUTICA

Abans de prosseguir, cal tenir en compte que encara que es mencionin i s'agafin com a referència les aprovacions o no per part de la FDA (Food and Drug Administration dels Estats Units) sobre l'ús terapèutic de la toxina botulínica, cada país té la seva legislació, que pot variar, i que s'ha de consultar abans de qualsevol aplicació de les toxines.

Durant les guerres napoleòniques, al ducat de Württemberg a Stuttgart, es va observar l'augment de morts per intoxicacions atribuïdes al consum de menjar en mal estat, concretament, de salsitxes fumades. Justinus Kerner (metge i poeta, 1786-1862) va realitzar la primera descripció clínica detallada del botulisme, així com del seu possible potencial per al tractament d'algunes alteracions d'origen nerviós o muscular. Va demostrar la relació entre la malaltia i el menjar en mal estat i inicialment va pensar que era una toxina present en el greix (l'anomenava *veri de les salsitxes* o *del greix*). Va deduir, a partir dels símptomes clínics i de les seves observacions experimentals, que la toxina actuava suspenent la transmissió al sistema nerviós perifèric motor i al sistema simpàtic i parasimpàtic, però deixant la transmissió sensorial intacta. També va proposar l'ús de la toxina com a teràpia en aquells casos en què en el sistema nerviós, sobretot el simpàtic, es trobava hiperactivat i hiperexcitat, i en els casos d'hipersecreció de fluids corporals, entre altres aplicacions. Arran dels seus estudis, al botulisme (en aquella època, la intoxicació per salsitxes) se'l coneixia com a *malaltia de Kerner*. No va ser fins a l'any 1870 que un altre metge alemany, Müller, li va donar el nom de *botulisme* a la intoxicació per salsitxes (del llatí *botulus*, salsitxa). El 1895, a partir d'un episodi de botulisme causat pel consum de pernil en conserva a Ellezelles (Bèlgica), Emile-Pierre van Ermengem, professor de bacteriologia a la Universitat de Ghent que havia estat al laboratori de Robert Koch, va relacionar, aïllar i identificar un bacteri gram positiu, anaeròbic i productor d'espores com a causant del botulisme, i l'anomenà inicialment *Bacillus botulinus* (Erbguth i Naumann, 1999). Aquest nom al cap d'uns anys va ser canviat pel de *Clostridium botulinum*, que s'ha mantingut fins al moment. L'any 1949 es va descriure que la toxina botulínica (de tipus A) actuava sobre la unió neuromuscular inhibint la secreció d'acetilcolina (Burgen *et al.*, 1949).

La toxina botulínica de tipus A va ser purificada al començament de la dècada dels anys vint del segle passat pel doctor Herman Sommer de la Universitat de Califòrnia, i cristal·litzada en forma de complex el 1946 pel doctor Edward J. Schantz de la Universitat de Wisconsin a Madison. Això va permetre un estudi més detallat de la toxina botulínica de tipus A, tant del seu mecanisme d'acció com de la seva possible aplicació terapèutica. L'any 1979, el doctor Schantz va purificar una remesa de toxina botulínica cristal·lina, que ha estat l'única que ha rebut l'aprovació de

la FDA per al seu ús (comercialitzada ara com a Botox) fins a la nova remesa aprovada el 1997 (Klein, 2002). Encara que Justinus Kerner ja va suggerir els possibles usos terapèutics de la toxina botulínica al primer quart del segle XIX, no va ser fins al 1973 que el doctor Alan Scott de la Smitt-Kettlewell Eye Research Foundation a San Francisco, utilitzant la toxina purificada pel doctor Schantz, va realitzar els primers experiments per al tractament de l'estrabisme en micos, i el 1978, en voluntaris humans. El 1989 la FDA va aprovar la utilització de la toxina botulínica de tipus A amb el nom d'Oculinum (Oculinum, inc., fundada pel doctor Alan Scott) per al tractament de l'estrabisme i el blefarospasme. Oculinum va ser adquirit per la companyia Allergan per a la seva distribució i futures aplicacions i poc després va canviar al nom actual de Botox. La utilització amb èxit de la toxina botulínica de tipus A per al tractament d'aquestes alteracions neuromusculars va ser el començament per a l'ús més ampli d'aquesta toxina en les afeccions musculars caracteritzades per la contracció muscular involuntària. A finals de l'any 2000, la FDA va aprovar la utilització de la toxina botulínica de tipus A (Botox) per al tractament de la distonia cervical en adults, per corregir la posició anormal del cap i el dolor de coll associat. Els anys vuitanta, la doctora Jean Carruthers, oftalmòloga canadenca, es va adonar de l'aspecte més relaxat que tenien els pacients tractats amb toxina botulínica per al blefarospasme, i juntament amb el seu marit, van iniciar els estudis per al tractament d'arrugues facials (Carruthers, 2002). Recentment, la FDA ha aprovat la utilització de la toxina botulínica de tipus A (Botox Cosmetics) en el camp de la cosmètica, per a l'eliminació d'arrugues en adults provocades per la contracció prolongada de músculs facials, possiblement una de les aplicacions més sorprenents de la toxina més potent que existeix.

La utilització de la toxina botulínica de tipus A s'ha anat estenent a altres alteracions en què la relaxació muscular o la inhibició de la secreció d'acetilcolina dels terminals nerviosos perifèrics pot suposar una millora dels símptomes. Algunes de les aplicacions que s'han descrit inclouen l'espasticitat de la laringe (disfonia espasmòdica), tremolors a les mans i espasmes als músculs de l'esquena i les extremitats, fissura anal, músculs distònics o espàstics a la paràlisi cerebral (aquest ús ha estat aprovat a Europa però no encara als Estats Units) o acalàsia esofàgica, entre d'altres.

A començaments dels anys noranta, es va observar que els pacients tractats amb la toxina patien menys dolors de cap i per tant s'està considerant i provant el seu ús per al tractament de la migranya i altres dolors associats a trastorns musculars, com el dolor miofacial, la fibromiàlgia, el mal d'esquena, d'extremitats...

També s'ha provat amb èxit la utilització de la toxina botulínica de tipus A en el camp de la hipersecreció glandular, com la hiperhidrosi (excessiva sudoració) o el pialisme (hipersalivació).

Finalment, la utilització de la toxina botulínica en casos d'obesitat està en fase experimental inicial, però se n'ha referenciat alguna experiència i s'intenta empen-



dre estudis pilot per avaluar-ne l'eficàcia (Rollnik *et al.*, 2003). Els resultats obtinguts en animals fan pensar que la injecció de toxina botulínica a la paret gàstrica pot inhibir la seva musculatura, i provocar un alentiment en el buidat gàstric i una acceleració de la sensació de sacietat. D'aquesta manera es pot reduir el pes corporal en reduir la quantitat de menjar ingerit.

Actualment, la toxina botulínica de tipus A es comercialitza amb el nom de Botox (de la casa Allergan, amb seu als Estats Units) i Dysport (de la casa Ipsen, Ltd., amb seu a Anglaterra). Aquestes toxines s'apliquen per injeccions molt localitzades. L'efecte és temporal, que pot ser de setmanes a uns mesos, depenent del temps que es triga a regenerar els terminals, de manera que per mantenir-ne els efectes s'han de realitzar noves injeccions. Un dels problemes associats a aquest tipus de tractament, i que en limita l'ús, és la generació d'anticossos contra la toxina, de manera que en aquests casos se n'ha d'injectar més dosi per obtenir el mateix efecte, fins al punt que pot arribar a ser inefectiva. Per resoldre aquest problema s'utilitzen bàsicament dues estratègies. Una és la de produir i experimentar toxines botulíniques d'altres tipus (Ludlow *et al.*, 1992; Eleopra *et al.*, 1997, 1998). D'entre la resta de toxines botulíniques, fins al moment tan sols s'ha arribat a comercialitzar a partir de l'any 2000 la de tipus B, per al tractament de la distonia cervical o torticolí espàstica (nom comercial, Myobloc, de la casa Elan). La resta de toxines botulíniques s'han anat estudiant per a la seva aplicació terapèutica sense que fins al moment presentin una bona alternativa a la de tipus A, ja que tenen poca eficàcia o especificitat per al múscul humà i/o menys temps d'activitat després de la injecció (Pellizzari *et al.*, 1999). L'altra estratègia consisteix a modificar les toxines per obtenir preparacions més pures, menys antigèniques, amb més activitat i/o amb efecte més durador.

## BIBLIOGRAFIA

- AGUI, T.; SYUTO, B.; OGUMA, K.; IIDA, H.; KUBO, S. (1985). «The structural relation between the antigenic determinants to monoclonal antibodies and binding sites to rat brain synaptosomes and GT1b ganglioside in *Clostridium botulinum* type C neurotoxin». *J. Biochem.* [Tokyo], núm. 97, p. 213-218.
- AHNERT-HILGER, G.; BIGALKE, H. (1995). «Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning». *Prog. Neurobiol.*, núm. 46, p. 83-96.
- ALMERS, W.; TSE, F. W. (1990). «Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis?». *Neuron*, núm. 4, p. 813-818.
- ARNON, S. S.; MIDURA, T. F.; DAMUS, K.; THOMPSON, B.; WOOD, R. M.; CHIN, J. (1979). «Honey and other environmental risk factors for infant botulism». *J. Pediatr.*, núm. 94, p. 331-336.
- ARNON, S. S.; SCHECHTER, R.; INGLESBY, T. V.; HENDERSON, D. A.; BARTLETT, J. G.; ASCHER, M. S.; EITZEN, E.; FINE, A. D.; HAUER, J.; LAYTON, M.; LILLIBRIDGE, S.;

- OSTERHOLM, M. T.; O'TOOLE, T.; PARKER, G.; PERL, T. M.; RUSSELL, P. K.; SWERDLOW, D. L.; TONAT, K. (2001). «Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management». *JAMA*, núm. 285, p. 1059-1070.
- AUGUSTINE, G. J.; BURNS, M. E.; DEBELLO, W. M.; HILFIKER, S.; MORGAN, J. R.; SCHWEIZER, F. E.; TOKUMARU, H.; UYAHARA, K. (1999). «Proteins involved in synaptic vesicle trafficking». *J. Physiol.*, núm. 520 (1), p. 33-41.
- BIZZINI, B. (1989). «Axoplasmic transport and transsynaptic movement of tetanus toxin». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 203-229.
- BLASI, J.; CHAPMAN, E. R.; LINK, E.; BINZ, T.; YAMASAKI, S.; DE CAMILLI, P.; SUDHOF, T. C.; NIEMANN, H.; JAHN, R. (1993a). «Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25». *Nature*, núm. 365, p. 160-163.
- BLASI, J.; CHAPMAN, E. R.; YAMASAKI, S.; BINZ, T.; NIEMANN, H.; JAHN, R. (1993b). «Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin». *EMBO J.*, núm. 12, p. 4821-4828.
- BLASI, J.; EGEA, G.; CASTIELLA, M. J.; ARRIBAS, M.; SOLSONA, C.; RICHARDSON, P. J.; MARSAL, J. (1992). «Binding of botulinum neurotoxin to pure cholinergic nerve terminals isolated from the electric organ of Torpedo». *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, núm. 90, p. 87-102.
- BLAUSTEIN, R. O.; GERMANN, W. J.; FINKELSTEIN, A.; DASGUPTA, B. R. (1987). «The N-terminal half of the heavy chain of botulinum type A neurotoxin forms channels in planar phospholipid bilayers». *FEBS Lett.*, núm. 226, p. 115-120.
- BOCK, J. B.; MATERN, H. T.; PEDEN, A. A.; SCHELLER, R. H. (2001). «A genomic perspective on membrane compartment organization». *Nature*, núm. 409, p. 839-841.
- BROSE, N.; ROSENEMUND, C.; RETTIG, J. (2000). «Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues». *Curr. Opin. Neurobiol.*, núm. 10, p. 303-311.
- BRUNGER, A. T. (2001). «Structural insights into the molecular mechanism of calcium-dependent vesicle-membrane fusion». *Curr. Opin. Struct. Biol.*, núm. 11, p. 163-173.
- BRUNS, D.; JAHN, R. (1995). «Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles». *Nature*, núm. 377, p. 62-65.
- BULLENS, R. W.; O'HANLON, G. M.; WAGNER, E.; MOLENAAR, P. C.; FURUKAWA, K.; PLOMP, J. J.; WILLISON, H. J. (2002). «Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function». *J. Neurosci.*, núm. 22, p. 6876-6884.
- BURGEN, A. S. V.; DICKENS, F.; ZATMAN, L. J. (1949). «The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction». *J. Physiol.*, núm. 109, p. 10-24.
- CALAKOS, N.; SCHELLER, R. H. (1994). «Vesicle-associated membrane protein and synaptophysin are associated on the synaptic vesicle». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, p. 24534-24537.
- CARRUTHERS, A. (2002). «Botulinum toxin type A: history and current cosmetic use in the upper face». *Dis. Mon.*, núm. 48, p. 299-322.
- CHAPMAN, E. R. (2002). «Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis?». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, núm. 3, p. 498-508.
- CHEN, Y. A.; SCHELLER, R. H. (2001). «SNARE-mediated membrane fusion». *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, núm. 2, p. 98-106.

- CHERINGTON, M. (1998). «Clinical spectrum of botulism». *Muscle Nerve*, núm. 21, p. 701-710.
- CRITCHLEY, D. R.; HABIG, W. H.; FISHMAN, P. H. (1986). «Reevaluation of the role of gangliosides as receptors for tetanus toxin». *J. Neurochem.*, núm. 47, p. 213-222.
- DASGUPTA, B. R. (1989). «The Structure of botulinum neurotoxin». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 53-67.
- DONOVAN, J. J.; MIDDLEBROOK, J. L. (1986). «Ion-conducting channels produced by botulinum toxin in planar lipid membranes». *Biochemistry*, núm. 25, p. 2872-2876.
- DREYER, F. (1989). «Peripheral actions of tetanus toxin». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 179-202.
- DULUBOVA, I.; SUGITA, S.; HILL, S.; HOSAKA, M.; FERNANDEZ, I.; SUDHOF, T. C.; RIZO, J. (1999). «A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18». *EMBO J.*, núm. 18, p. 4372-4382.
- EDELMANN, L.; HANSON, P. I.; CHAPMAN, E. R.; JAHN, R. (1995). «Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine». *EMBO J.*, núm. 14, p. 224-231.
- ELEOPRA, R.; TUGNOLI, V.; ROSSETTO, O.; MONTECUCCO, C.; DE GRANDIS, D. (1997). «Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human». *Neurosci. Lett.*, núm. 224, p. 91-94.
- (1998). «Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans». *Neurosci. Lett.*, núm. 256, p. 135-138.
- EMSLEY, P.; FOTINO, C.; BLACK, I.; FAIRWEATHER, N. F.; CHARLES, I. G.; WATTS, C.; HEWITT, E.; ISAACS, N. W. (2000). «The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding». *J. Biol. Chem.*, núm. 275, p. 8889-8894.
- ERBGUTH, F. J.; NAUMANN, M. (1999). «Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786-1862) and the «sausage poison»». *Neurology*, núm. 53, p. 1850-1853.
- FOTINO, C.; EMSLEY, P.; BLACK, I.; ANDO, H.; ISHIDA, H.; KISO, M.; SINHA, K. A.; FAIRWEATHER, N. F.; ISAACS, N. W. (2001). «The crystal structure of tetanus toxin Hc fragment complexed with a synthetic GT1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin». *J. Biol. Chem.*, núm. 276, p. 32274-32281.
- FRANZ, D. R.; PITT, L. M.; CLAYTON, M. A.; HANES, M. A.; ROSE, K. J. (1993). «Efficacy of prophylactic and therapeutic administration of antitoxin for inhalation botulism». A: DASGUPTA, B. R. [ed.]. *Botulinum and tetanus neurotoxins. Neurotransmission and biomedical aspects*. Nova York: Plenum Press, p. 473-476.
- FUJITA, Y.; SHIRATAKI, H.; SAKISAKA, T.; ASAKURA, T.; OHYA, T.; KOTANI, H.; YOKOYAMA, S.; NISHIOKA, H.; MATSUURA, Y.; MIZOGUCHI, A.; SCHELLER, R. H.; TAKAI, Y. (1998). «Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process». *Neuron*, núm. 20, p. 905-915.
- GILL, D. M. (1982). «Bacterial toxins: a table of lethal amounts». *Microbiol. Rev.*, núm. 46, p. 86-94.
- GINALSKI, K.; VENCIOVAS, C.; LESYNG, B.; FIDELIS, K. (2000). «Structure-based sequence alignment for the beta-trefoil subdomain of the clostridial neurotoxin family provides

- residue level information about the putative ganglioside binding site». *FEBS Lett.*, núm. 482, p. 119-124.
- HANSON, M. A.; STEVENS, R. C. (2000). «Cocrystal structure of synaptobrevin-II bound to botulinum neurotoxin type B at 2.0 Å resolution». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 7, p. 687-692.
- HATHEWAY, C. L. (1989). «Bacterial sources of clostridial neurotoxins». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 3-24.
- HERREROS, J.; LALLI, G.; MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. (2000). «Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons». *J. Neurochem.*, núm. 74, p. 1941-1950.
- HERREROS, J.; NG, T.; SCHIAVO, G. (2001). «Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons». *Mol. Biol. Cell*, núm. 12, p. 2947-2960.
- HOCH, D. H.; ROMERO-MIRA, M.; EHRLICH, B. E.; FINKELSTEIN, A.; DASGUPTA, B. R.; SIMPSON, L. L. (1985). «Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 82, p. 1692-1696.
- JAHN, R.; LANG, T.; SUDHOF, T. C. (2003). «Membrane fusion». *Cell*, núm. 112, p. 519-533.
- JAHN, R.; SUDHOF, T. C. (1999). «Membrane fusion and exocytosis». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 68, p. 863-911.
- JONGENEEL, C. V.; BOUVIER, J.; BAIROCH, A. (1989). «A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases». *FEBS Lett.*, núm. 242, p. 211-214.
- KITAMURA, M. (1976). «Binding of botulinum neurotoxin to the synaptosome fraction of rat brain». *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, núm. 295, p. 171-175.
- KLEIN, A. W. (2002). «Introduction. Botox». *Dis. Mon.*, núm. 48, p. 296-298.
- KORIAZOVA, L. K.; MONTAL, M. (2003). «Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 10, p. 13-18.
- KOZAKI, S.; KAMATA, Y.; WATARAI, S.; NISHIKI, T.; MOCHIDA, S. (1998). «Ganglioside GT1b as a complementary receptor component for Clostridium botulinum neurotoxins». *Microb. Pathog.*, núm. 25, p. 91-99.
- KUBOTA, T.; WATANABE, T.; YOKOSAWA, N.; TSUZUKI, K.; INDOH, T.; MORIISHI, K.; SANDA, K.; MAKI, Y.; INOUE, K.; FUJII, N. (1997). «Epitope regions in the heavy chain of Clostridium botulinum type E neurotoxin recognized by monoclonal antibodies». *Appl. Environ. Microbiol.*, núm. 63, p. 1214-1218.
- KUDROW, D. B.; HENRY, D. A.; HAAKE, D. A.; MARSHALL, G.; MATHISEN, G. E. (1988). «Botulism associated with Clostridium botulinum sinusitis after intranasal cocaine abuse». *Ann. Intern. Med.*, núm. 109, p. 984-985.
- KURAZONO, H.; MOCHIDA, S.; BINZ, T.; EISEL, U.; QUANZ, M.; GREBENSTEIN, O.; WERNARS, K.; POULAIN, B.; TAUC, L.; NIEMANN, H. (1992). «Minimal essential domains specifying toxicity of the light chains of tetanus toxin and botulinum neurotoxin type A». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, p. 14721-14729.
- LACY, D. B.; STEVENS, R. C. (1999). «Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins». *J. Mol. Biol.*, núm. 291, p. 1091-1104.

- LACY, D. B.; TEPP, W.; COHEN, A. C.; DASGUPTA, B. R.; STEVENS, R. C. (1998). «Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 5, p. 898-902.
- LALLI, G.; HERREROS, J.; OSBORNE, S. L.; MONTECUCCO, C.; ROSSETTO, O.; SCHIAVO, G. (1999). «Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains». *J. Cell. Sci.*, núm. 112 (16), p. 2715-2724.
- LALLI, G.; SCHIAVO, G. (2002). «Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR». *J. Cell Biol.*, núm. 156, p. 233-239.
- LAZAROVICI, P.; YAVIN, E. (1986). «Affinity-purified tetanus neurotoxin interaction with synaptic membranes: properties of a protease-sensitive receptor component». *Biochemistry*, núm. 25, p. 7047-7054.
- LI, L.; SINGH, B. R. (1998). «Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxin and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay». *J. Nat. Toxins*, núm. 7, p. 215-226.
- LUDLOW, C. L.; HALLETT, M.; RHEW, K.; COLE, R.; SHIMIZU, T.; SAKAGUCHI, G.; BAGLEY, J. A.; SCHULZ, G. M.; YIN, S. G.; KODA, J. (1992). «Therapeutic use of type F botulinum toxin». *N. Engl. J. Med.*, núm. 326, p. 349-350.
- MAKSYMOWYCH, A. B.; REINHARD, M.; MALIZIO, C. J.; GOODNOUGH, M. C.; JOHNSON, E. A.; SIMPSON, L. L. (1999). «Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade». *Infect. Immun.*, núm. 67, p. 4708-4712.
- MAKSYMOWYCH, A. B.; SIMPSON, L. L. (1998). «Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human colon carcinoma cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, p. 21950-21957.
- MARTIN, T. F. (2002). «Prime movers of synaptic vesicle exocytosis». *Neuron*, núm. 34, p. 9-12.
- MCCROSKEY, L. M.; HATHEWAY, C. L. (1988). «Laboratory findings in four cases of adult botulism suggest colonization of the intestinal tract». *J. Clin. Microbiol.*, núm. 26, p. 1052-1054.
- MCMAHON, H. T.; USHKARYOV, Y. A.; EDELMANN, L.; LINK, E.; BINZ, T.; NIEMANN, H.; JAHN, R.; SUDHOF, T. C. (1993). «Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein». *Nature*, núm. 364, p. 346-349.
- MELLANBY, J. (1984). «Comparative activities of tetanus and botulinum toxins». *Neuroscience*, núm. 11, p. 29-34.
- MERSON, M. H.; DOWELL, V. R. J. (1973). «Epidemiologic, clinical and laboratory aspects of wound botulism». *N. Engl. J. Med.*, núm. 289, p. 1105-1110.
- MIDDLEBROOK, J. L. (1989). «Cell surface receptors for protein toxins». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 95-119.
- MIDURA, T. F. (1996). «Update: infant botulism». *Clin. Microbiol. Rev.*, núm. 9, p. 119-125.
- MIDURA, T. F.; ARNON, S. S. (1976). «Infant botulism. Identification of *Clostridium botulinum* and its toxins in faeces». *Lancet*, núm. 2, p. 934-936.

- MIDURA, T. F.; SNOWDEN, S.; WOOD, R. M.; ARNON, S. S. (1979). «Isolation of *Clostridium botulinum* from Honey». *J. Clin. Microbiol.*, núm. 9, p. 282-283.
- MISURA, K. M.; SCHELLER, R. H.; WEIS, W. I. (2000). «Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex». *Nature*, núm. 404, p. 355-362.
- MONTECUCCO, C. (1986). «How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes?». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 11, p. 314-317.
- MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. (1995). «Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins». *Q. Rev. Biophys.*, núm. 28, p. 423-472.
- NEHER, E. (1998). «Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release». *Neuron*, núm. 20, p. 389-399.
- NIEMANN, H.; BLASI, J.; JAHN, R. (1994). «Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis». *Trends Cell Biol.*, núm. 4, p. 179-185.
- NISHIKI, T.; KAMATA, Y.; NEMOTO, Y.; OMORI, A.; ITO, T.; TAKAHASHI, M.; KOZAKI, S. (1994). «Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, p. 10498-10503.
- NISHIKI, T.; TOKUYAMA, Y.; KAMATA, Y.; NEMOTO, Y.; YOSHIDA, A.; SATO, K.; SEKIGUCHI, M.; TAKAHASHI, M.; KOZAKI, S. (1996). «The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a». *FEBS Lett.*, núm. 378, p. 253-257.
- OCHANDA, J. O.; SYUTO, B.; OHISHI, I.; NAIKI, M.; KUBO, S. (1986). «Binding of *Clostridium botulinum* neurotoxin to gangliosides». *J. Biochem. [Tokyo]*, núm. 100, p. 27-33.
- OGUMA, K.; YOKOTA, K.; HAYASHI, S.; TAKESHI, K.; KUMAGAI, M.; ITOH, N.; TACHI, N.; CHIBA, S. (1990). «Infant botulism due to *Clostridium botulinum* type C toxin». *Lancet*, núm. 336, p. 1449-1450.
- PARK, J. B.; SIMPSON, L. L. (2003). «Inhalational poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy-chain component». *Infect. Immun.*, núm. 71, p. 1147-1154.
- PARTON, R. G.; OCKLEFORD, C. D.; CRITCHLEY, D. R. (1988). «Tetanus toxin binding to mouse spinal cord cells: an evaluation of the role of gangliosides in toxin internalization». *Brain Res.*, núm. 475, p. 118-127.
- PELLIZZARI, R.; ROSSETTO, O.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. (1999). «Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses». *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, núm. 354, p. 259-268.
- PEREZ-BRANGULI, F.; MUHAISEN, A.; BLASI, J. (2002). «Munc 18a binding to syntaxin 1A and 1B isoforms defines its localization at the plasma membrane and blocks SNARE assembly in a three-hybrid system assay». *Mol. Cell. Neurosci.*, núm. 20, p. 169-180.
- PEVSNER, J.; HSU, S. C.; SCHELLER, R. H. (1994). «n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, p. 1445-1449.
- PICKETT, J.; BERG, B.; CHAPLIN, E.; BRUNSTETTER-SHAFER, M. A. (1976). «Syndrome of botulism in infancy: clinical and electrophysiologic study». *N. Engl. J. Med.*, núm. 295, p. 770-772.
- RAPPUOLI, R.; MONTECUCCO, C. [ed.] (1997). *Guidebook to protein toxins and their use in cell biology*. Oxford University Press. (Sambrook & Tooze)

- RIZO, J.; SUDHOF, T. C. (2002). «Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion». *Nat. Rev. Neurosci.*, núm. 3, p. 641-653.
- ROGERS, T. B.; SNYDER, S. H. (1981). «High affinity binding of tetanus toxin to mammalian brain membranes». *J. Biol. Chem.*, núm. 256, p. 2402-2407.
- ROLLNIK, J. D.; MEIER, P. N.; MANNS, M. P.; GOKE, M. (2003). «Antral injections of botulinum a toxin for the treatment of obesity». *Ann. Intern. Med.*, núm. 138, p. 359-360.
- ROSSETTO, O.; DELOYE, F.; POULAIN, B.; PELLIZZARI, R.; SCHIAVO, G.; MONTECUCCO, C. (1995). «The metallo-proteinase activity of tetanus and botulinum neurotoxins». *J. Physiol. [París]*, núm. 89, p. 43-50.
- ROTHMAN, J. E. (1994). «Intracellular membrane fusion». *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, núm. 29, p. 81-96.
- (1996). «Felix Hoppe-Seyler Lecture 1996. Mechanisms of intracellular protein transport». *Biol. Chem.*, núm. 377, p. 407-410.
- SCHECHTER, R.; ARNON, S. S. (2000). «Extreme potency of botulinum toxin». *Lancet*, núm. 355, p. 237-238.
- SCHENGRUND, C. L.; DASGUPTA, B. R.; RINGLER, N. J. (1991). «Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof». *J. Neurochem.*, núm. 57, p. 1024-1032.
- SCHIAVO, G.; BENFENATI, F.; POULAIN, B.; ROSSETTO, O.; POLVERINO DE LAURETO, P.; DASGUPTA, B. R.; MONTECUCCO, C. (1992b). «Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin». *Nature*, núm. 359, p. 832-835.
- SCHIAVO, G.; FERRARI, G.; ROSSETTO, O.; MONTECUCCO, C. (1991). «Tetanus toxin receptor. Specific cross-linking of tetanus toxin to a protein of NGF-differentiated PC 12 cells». *FEBS Lett.*, núm. 290, p. 227-230.
- SCHIAVO, G.; MALIZIO, C.; TRIMBLE, W. S.; POLVERINO DE LAURETO, P.; MILAN, G.; SUGIYAMA, H.; JOHNSON, E. A.; MONTECUCCO, C. (1994). «Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, p. 20213-20216.
- SCHIAVO, G.; ROSSETTO, O.; SANTUCCI, A.; DASGUPTA, B. R.; MONTECUCCO, C. (1992a). «Botulinum neurotoxins are zinc proteins». *J. Biol. Chem.*, núm. 267, p. 23479-23483.
- SCHIAVO, G.; SHONE, C. C.; BENNETT, M. K.; SCHELLER, R. H.; MONTECUCCO, C. (1995). «Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins». *J. Biol. Chem.*, núm. 270, p. 10566-10570.
- SCHIAVO, G.; SHONE, C. C.; ROSSETTO, O.; ALEXANDER, F. C.; MONTECUCCO, C. (1993). «Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, p. 11516-11519.
- SCHWAB, M. E.; SUDA, K.; THOENEN, H. (1979). «Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport». *J. Cell Biol.*, núm. 82, p. 798-810.
- SHAPIRO, R. E.; SPECHT, C. D.; COLLINS, B. E.; WOODS, A. S.; COTTER, R. J.; SCHNAAR, R. L. (1997). «Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand». *J. Biol. Chem.*, núm. 272, p. 30380-30386.

- SHERIDAN, R. E. (1998). «Gating and permeability of ion channels produced by botulinum toxin types A and E in PC12 cell membranes». *Toxicon*, núm. 36, p. 703-717.
- SHONE, C. C.; HAMBLETON, P.; MELLING, J. (1985). «Inactivation of Clostridium botulinum type A neurotoxin by trypsin and purification of two tryptic fragments. Proteolytic action near the COOH-terminus of the heavy subunit destroys toxin-binding activity». *Eur. J. Biochem.*, núm. 151, p. 75-82.
- SIMPSON, L. L. (1989). «Peripheral actions of the botulinum toxins». A: SIMPSON, L. L. [ed.]. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, inc., p. 153-178.
- SINGH, B. R. (2000). «Intimate details of the most poisonous poison». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 7, p. 617-619.
- SOLLNER, T.; WHITEHEART, S. W.; BRUNNER, M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; GEROMANOS, S.; TEMPST, P.; ROTHMAN, J. E. (1993). «SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion». *Nature*, núm. 362, p. 318-324.
- SUDHOF, T. C. (1995). «The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions». *Nature*, núm. 375, p. 645-653.
- SUGIYAMA, H. (1980). «Clostridium botulinum neurotoxin». *Microbiol. Rev.*, núm. 44, p. 419-448.
- SUTTON, R. B.; FASSHAUER, D.; JAHN, R.; BRUNGER, A. T. (1998). «Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution». *Nature*, núm. 395, p. 347-353.
- SWAMINATHAN, S.; ESWARAMOORTHY, S. (2000). «Structural analysis of the catalytic and binding sites of Clostridium botulinum neurotoxin B». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 7, p. 693-699.
- UMLAND, T. C.; WINGERT, L.; SWAMINATHAN, S.; SCHMIDT, J. J.; SAX, M. (1998). «Crystallization and preliminary X-ray analysis of tetanus neurotoxin C fragment». *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, núm. 54 (2), p. 273-275.
- VERHAGE, M.; MAIA, A. S.; PLOMP, J. J.; BRUSSAARD, A. B.; HEEROMA, J. H.; VERMEER, H.; TOONEN, R. F.; HAMMER, R. E.; BERG, T. K. van den; MISSLER, M.; GEUZE, H. J.; SUDHOF, T. C. (2000). «Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion». *Science*, núm. 287, p. 864-869.
- VOETS, T.; TOONEN, R. F.; BRIAN, E. C.; DE WIT, H.; MOSER, T.; RETTIG, J.; SUDHOF, T. C.; NEHER, E.; VERHAGE, M. (2001). «Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking». *Neuron*, núm. 31, p. 581-591.
- WEBER, J. T.; GOODPASTURE, H. C.; ALEXANDER, H.; WERNER, S. B.; HATHEWAY, C. L.; TAUXE, R. V. (1993). «Wound botulism in a patient with a tooth abscess: case report and review». *Clin. Infect. Dis.*, núm. 16, p. 635-639.
- WEBER, T.; ZEMELMAN, B. V.; MCNEW, J. A.; WESTERMANN, B.; GMACHL, M.; PARLATI, F.; SOLLNER, T. H.; ROTHMAN, J. E. (1998). «SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion». *Cell*, núm. 92, p. 759-772.
- WELLHONER, N. H. (1982). «Tetanus neurotoxin». *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, núm. 93, p. 1-68.
- WILLIAMSON, L. C.; HALPERN, J. L.; MONTECUCCO, C.; BROWN, J. E.; NEALE, E. A. (1996). «Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons: botulinum neuro-



- toxin C acts on synaptosomal-associated protein of 25 kDa». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, p. 7694-7699.
- WILSON, D. W.; WHITEHEART, S. W.; WIEDMANN, M.; BRUNNER, M.; ROTHMAN, J. E. (1992). «A multisubunit particle implicated in membrane fusion». *J. Cell Biol.*, núm. 117, p. 531-538.
- XU, T.; BINZ, T.; NIEMANN, H.; NEHER, E. (1998). «Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity». *Nat. Neurosci.*, núm. 1, p. 192-200.
- YAMASAKI, S.; BAUMEISTER, A.; BINZ, T.; BLASI, J.; LINK, E.; CORNILLE, F.; ROQUES, B.; FYKSE, E. M.; SUDHOF, T. C.; JAHN, R. (1994a). «Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinic neurotoxins and tetanus toxin». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, p. 12764-12772.
- YAMASAKI, S.; BINZ, T.; HAYASHI, T.; SZABO, E.; YAMASAKI, N.; EKLUND, M.; JAHN, R.; NIEMANN, H. (1994b). «Botulinum neurotoxin type G proteolyzes the Ala81-Ala82 bond of rat synaptobrevin 2». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 200, p. 829-835.
- YAVIN, E.; YAVIN, Z.; HABIG, W. H.; HARDEGREE, M. C.; KOHN, L. D. (1981). «Tetanus toxin association with developing neuronal cell cultures. Kinetic parameters and evidence for ganglioside-mediated internalization». *J. Biol. Chem.*, núm. 256, p. 7014-7022.
- YAVIN, E.; YAVIN, Z.; KOHN, L. D. (1983). «Temperature-mediated interaction of tetanus toxin with cerebral neuron cultures: characterization of a neuraminidase-insensitive toxin-receptor complex». *J. Neurochem.*, núm. 40, p. 1212-1219.

## ALGUNES ADRECES D'INTERNET

Hi ha un gran nombre d'adreces d'Internet on la persona interessada es pot adreçar per obtenir més informació sobre el tema. Les que es relacionen a continuació en són una mostra.

## INFORMACIÓ GENERAL

- <http://www.bt.cdc.gov/agent/botulism/index.asp>
- <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap2.html>
- <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/nother/bot.htm#infant>
- <http://iaith.tapetrade.net/botulism/>
- <http://www.emedicine.com/plastic/byname/botox-injections.htm>
- <http://www.emedicine.com/ped/topic273.htm>
- <http://us.expasy.org/spotlight/articles/sptlt019.html>

COMPARACIÓ DE LETALITATS

— <http://www.mitretek.org/home.nsf/HomelandSecurity/Toxins>

ADMINISTRACIÓ INTRANASAL DE TOXINA BOTULÍNICA PER A VACUNACIÓ

— <http://news.cnet.com/investor/news/newsitem/0-9900-1028-20927919-0.html>

ADMINISTRACIÓ PER A COSMÈTICA

— <http://www.shorelaser.com/BotoxA.html>

— <http://www.botox-debate.com/>

BIOTERRORISME - GUERRA BIOLÒGICA

— [http://www.gulfink.osd.mil/bw/bw\\_s01.htm](http://www.gulfink.osd.mil/bw/bw_s01.htm)

— [http://www.vnh.org/MedAspChemBioWar/chapters/chapter\\_33.htm](http://www.vnh.org/MedAspChemBioWar/chapters/chapter_33.htm)

— [http://www.idsociety.org/bt/biotemplate.cfm?template=bot\\_resources.htm](http://www.idsociety.org/bt/biotemplate.cfm?template=bot_resources.htm)

— <http://dermatology.about.com/library/blbotulism.htm>

BOTULISME PER FERIDA

— <http://epbiwww.cwru.edu/mmwrpdf/vol44/mm4448.pdf>

— <http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/00039732.htm>



