



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Fisiología Celular

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO
DEGENERATIVO DE MOTONEURONAS
ESPINALES INDUCIDO POR
EXCITOTOXICIDAD IN VIVO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. URI NIMROD RAMÍREZ JARQUÍN

TUTOR PRINCIPAL: Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia

COMITÉ TUTOR:

Dra. Elvira Galarraga Palacio
Dr. Edmundo Chávez Cossío

MÉXICO, D.F.

Diciembre, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/565/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de agosto de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **RAMÍREZ JARQUÍN URI NIMROD** con número de cuenta **301100786** con la tesis titulada "**Caracterización del proceso degenerativo de motoneuronas espinales inducido por excitotoxicidad *in vivo***", realizada bajo la dirección del (la) **DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA**:

Presidente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
Secretario: DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA
Suplente: DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
Suplente: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de noviembre de 2010.

Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa



JNF/DCRV/ASR/ipp

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A CONACYT por otorgarme una beca durante mis estudios de maestría.

A las instituciones que financiaron el presente proyecto:

CONACYT (60322)
DGAPA, UNAM (IN215610)

Al Comité Tutoral, que asesoró el desarrollo del proyecto de esta tesis:

Dra. Elvira Galarraga Palacio	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Edmundo Chávez Cossío	Instituto Nacional de Cardiología
Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A los miembros del Jurado:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray	Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala, UNAM
Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM

A la unidad de microscopía del IFC por todo su apoyo y asesoría:

Méd. Cir. Rodolfo Paredes Días (Microscopía Electrónica)
Biol. Gabriel Orozco Hoyuela (Microscopía confocal)

Índice

I.- Resumen	4
Abstract.....	6
II.- Lista de abreviaturas	8
III.- Introducción	9
La Médula espinal	9
Anatomía y función	9
Principales circuitos neuronales	13
Inhibición: GABA y glicina	14
Excitación: Glutamato	17
Patologías relacionadas con la médula espinal	21
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).....	22
Modelos experimentales para el estudio de la ELA	24
Muerte celular por apoptosis y necrosis	27
IV.- Antecedentes	30
Parte I: Excitotoxicidad	31
Parte II: Modelos farmacológicos de degeneración espinal mediante la sobreactivación del receptor AMPA.....	32
Parte III: El ratón G93A en el estudio del proceso de muerte de las motoneuronas en la ELA	33
Parte IV: Modificaciones e importancia de los circuitos inhibitorios durante la ELA	34
V.- Hipótesis	36
VI.- Objetivos	37
VII.- Enfoque experimental y metodología	38
VIII.- Resultados	43
IX.- Discusión	68
X. - Conclusiones.....	77
XI. - Referencias.....	79

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una devastadora enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva y selectiva de las motoneuronas (MNs) superiores e inferiores, lo que causa una parálisis gradual que culmina con la muerte del paciente por un paro respiratorio. Aunque el origen y causa de esta enfermedad permanece desconocida, la muerte de las MNs se ha asociado con un fenómeno de excitotoxicidad mediado por glutamato a través de la acción de receptores tipo AMPA (α -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) permeables a calcio. Hasta la fecha, el tipo de muerte celular de las MNs durante la ELA no ha sido aclarado. Basados en la sobreactivación de los receptores AMPA, en nuestro laboratorio se diseñaron dos modelos de degeneración de las MNs espinales in vivo en rata: un modelo agudo de activación de los receptores AMPA, con el uso de la microdiálisis, y un modelo crónico de activación de los receptores AMPA, en el que se utilizan como vía de administración minibombas osmóticas. En el modelo agudo (Corona y Tapia, 2004), las MNs mueren de forma rápida (3 h) causando una parálisis ipsilateral, mientras que en el modelo crónico (Tovar-y-Romo et al., 2007) la muerte de las MNs y la parálisis ocurren de manera progresiva y bilateral (5 días). En esta tesis, con objeto de conocer y caracterizar el proceso de muerte de las MNs en ambos modelos, utilizamos la microscopía electrónica de transmisión para determinar los cambios morfológicos y ultraestructurales de las MNs, y la microscopia confocal para detectar mediante inmunocitoquímica la presencia de la caspasa 3 activa (casp3a) en las MNs. La función motora se evaluó mediante las pruebas de Rotarod, Paw Grip Endurance task (PGE, por sus siglas en inglés) y el registro de la zancada. Los resultados obtenidos demostraron que: en el modelo agudo las MNs mueren rápidamente, iniciando con un deterioro mitocondrial temprano (vesiculación de la membrana interna mitocondrial) a 1.5 h de la perfusión del AMPA 6 mM. Después de 3 h se observó la ruptura de las membranas mitocondrial, nuclear y citoplásmica. La muerte de las MNs en este modelo ocurre sin la activación de la casp3. Por otro lado, el tratamiento crónico con AMPA 7 mM indujo la muerte de las MNs mediante un proceso degenerativo que inicia 24 h después del implante de la minibomba osmótica, con el hinchamiento del retículo endoplásmico y la subsecuente aparición y crecimiento de vacuolas en el citoplasma, lo cual progresa hasta que ocurre la disolución celular, alrededor de las 48 y 72 h. Este proceso degenerativo inicia en el lado ipsilateral y se extiende paulatinamente a toda la población de MNs, incluyendo el asta ventral contralateral. Durante este proceso degenerativo identificamos dos poblaciones de mitocondrias, una de ellas presenta un hinchamiento mitocondrial y la vesiculación de la membrana interna, mientras que la otra no presenta alteraciones y preserva una morfología

normal, aún cuando la membrana celular se ha dañado. La degeneración de las MNs en este modelo se acompaña de la activación de la casp3. Nuestros resultados indican que la manera de sobreactivar al receptor AMPA *in vivo* (aguda o crónicamente) induce dos procesos diferentes de muerte en las MNs: uno rápido y otro progresivo, involucrando en este último la actividad de la casp3. Con base en estos resultados concluimos que las MNs en el modelo agudo mueren rápidamente por necrosis, mientras que en el modelo crónico el proceso degenerativo de las MNs presenta inicialmente características apoptóticas y culmina con una necrosis de lento progreso.

Un segundo objetivo de esta tesis fue determinar el efecto del bloqueo de los circuitos inhibitorios de la médula espinal e investigar su posible relación con la muerte de las MNs. Para este fin perfundimos crónica (5, 10 y 17.5 mM) y agudamente (1 y 5 mM) bicuculina (antagonista de los receptores para GABA tipo A, GABAA) o estriquina (1, 5 y 20 mM; antagonista de los receptores para glicina) en la región lumbar. Tanto el bloqueo agudo como el crónico de los receptores GABAA provocaron un efecto dosis dependiente caracterizado por la contracción de los músculos del cuarto trasero ipsilateral. Sin embargo, únicamente el bloqueo crónico de los receptores GABAA indujo una pérdida significativa de MNs. En cambio, el bloqueo de los receptores para glicina no provocó efectos significativos. Concluimos que los circuitos GABAérgicos de la médula espinal juegan un papel de gran importancia en el control de la actividad neuronal y coordinación de los músculos del cuarto trasero ipsilateral. Además, la hiperexcitabilidad inducida por el bloqueo de la actividad GABAérgica provoca una pérdida de MNs que no es suficiente para generar un déficit motriz.

Proponemos que el análisis de estos procesos de muerte y del papel de los circuitos inhibitorios en la médula espinal puede ayudar a entender el mecanismo de degeneración de las MNs en la ELA, y ayudar al diseño de estrategias para prevenir y atenuar la pérdida de las MNs en la ELA.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating neurodegenerative disease characterized by progressive and selective loss of upper and lower motoneurons (MNs), which causes gradual paralysis that culminates with patient's death by respiratory failure. Although the origin and cause of this disease remain unknown, the cell death of MNs is associated with a phenomenon of excitotoxicity mediated by glutamate through the action of calcium-permeable α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors. To date, the type of cell death of MNs in ALS has not been elucidated. Based on AMPA receptors overactivation, in our laboratory, we designed two *in vivo* models of spinal MNs degeneration in rat: an acute model of AMPA receptor activation using microdialysis (Corona and Tapia, 2004), and a chronic model of AMPA receptors activation, in which we used osmotic minipumps as route of administration (Tovar-y-Romo et al., 2007). In the acute model, MNs die quickly (3 h) resulting in ipsilateral paralysis, while in the chronic model the death of MNs and paralysis occur progressively and bilaterally (5 days). In this thesis, to understand and characterize the cell death of MNs on both models, we used transmission electron microscopy to determine morphological and ultrastructural changes of MNs, and confocal microscopy for active caspase-3 (casp3a) detection in MNs by immunocytochemistry labeling. Motor function was assessed using rotarod tests, Paw Grip Endurance task (PGE) and record stride. The results showed that: in the acute model, the MNs died quickly, starting with early mitochondrial damage (vesiculation of the inner mitochondrial membrane) at 1.5 h of 6 mM AMPA perfusion. After 3 h we observed the rupture of mitochondrial, nuclear and cytoplasmic membranes. The cell death of MNs in this model occurs without activation of casp3. On the other hand, chronic treatment with 7 mM AMPA induced cell death of MNs by a degenerative process that started 24 h after implantation of osmotic minipump, with swelling of the endoplasmic reticulum and the subsequent emergence and enlargement of vacuoles in the cytoplasm, which progresses until cell dissolution occurs, around 48 and 72 h. This degenerative process begins on the ipsilateral side and is gradually extended to the entire population of MNs, including the contralateral ventral horn. During this degenerative process we identified two mitochondria populations, one of them presents mitochondrial swelling and vesiculation of the inner membrane, while the other does not show alterations and preserves a normal morphology, even when the cell membrane is damaged. Degeneration of MNs in this model is accompanied by activation of casp3. Our results indicate that the way of overactivate AMPA receptor *in vivo*, acute or chronic, induces two different processes of cell death in MNs: one fast and other slow and progressive, involving in the activity of casp3. Based on these results, we conclude

that in the acute model MNs die rapidly by necrosis, whereas in the chronic model the degenerative process of MNs presents, initially, apoptotic features and culminates with a slowly progressive necrosis.

A second objective of this thesis was to determine the effect of the blockade of inhibitory circuits in the spinal cord and investigate their possible relation with MNs death. To this purpose, we perfused chronic (5, 10 and 17.5 mM) and acutely (1 and 5 mM), bicuculline (antagonist of GABA type A receptors, GABAA) or strychnine (1, 5 and 20 mM; glycine receptors antagonist) in lumbar region. Both acute and chronic blockade of GABAA receptors resulted in a dose dependent effect, characterized by the contraction of ipsilateral hindquarter muscles. However, only chronic blockade of GABAA receptors induced a significant loss of MNs. In contrast, glycine receptors blockade did not cause significant effects. We conclude that GABAergic circuits in the spinal cord play a major role in controlling neuronal activity and coordination of ipsilateral hindquarter muscles. Furthermore, hyperexcitability induced by GABAergic activity blockade results in loss of MNs that is not sufficient to generate a motor deficit.

We propose that analysis of these processes of cell death and the role of inhibitory circuits in the spinal cord may help to understand the mechanism of MNs degeneration in ALS, and help to design strategies for the prevention and dwindling of MNs loss in ALS.

Lista de abreviaturas

5-HT3: Receptor tipo 3 para serotonina
AMPA: α -amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AG: Aparato de Golgi
casp3a: Caspasa 3 activa
Bic: Bicuculina
ChAT: Colina acetiltransferasa
CR: Célula de Renshaw
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
GABA: Ácido gamma amino butírico
GABAARs: Receptores tipo A para GABA
GFAP: Proteína ácida de la glial fibrilar
Glu: Ácido glutámico ó glutamato
Gly: Glicina
GlyRs: Receptores para Gly
GTA: Gluteraldehido
KA: kainato
LCFR: Líquido cefalorraquídeo
m: Mitocondria
MCP: Muerte celular programada
MET: Microscopía electrónica de transmisión
MIM: Membrana interna mitocondrial
MN: Motoneurona
N: Núcleo
NT: Neurotransmisor
P: Posnatal
PB: Amortiguador de fosfatos (Buffer de fosfatos)
PFA: Paraformaldehido
PGE: Paw Grip Endurance task
RE: Retículo endoplásmico
SNC: Sistema Nervioso Central

III.- Introducción

LA MÉDULA ESPINAL

La médula espinal es la parte del sistema nervioso central (SNC) que se encuentra alojada en el conducto raquídeo desde el agujero magno, en la parte media arqueada del atlas hasta la primera o segunda vértebra lumbar. Es la encargada de comunicar al encéfalo con el cuerpo a través de impulsos nerviosos mediante dos funciones básicas: la aferente, en la que son llevados impulsos sensitivos del tronco, cuello y las cuatro extremidades hacia el cerebro, y la eferente, en la que el cerebro ordena a los órganos efectores realizar determinada acción, llevando estos impulsos hacia el tronco, cuello y extremidades. Entre sus funciones también se encuentran el control de movimientos inmediatos y vegetativos, como el acto reflejo, y las funciones del sistema nervioso simpático y el parasimpático. Se considera el tejido nervioso más extenso del cuerpo humano, pudiendo alcanzar los axones de sus neuronas hasta un metro de largo. La longitud de esta estructura varía ontogenéticamente: en el embrión se encuentra hasta la base del coxis, en el recién nacido la médula alcanza la cuarta vértebra lumbar (L4, dos vertebras por debajo del estado adulto). En su completo desarrollo la médula espinal alcanza una longitud de 45 cm en hombres y 43 cm en mujeres (Watson, et al., 2009).

Anatomía y función

Longitudinalmente la columna vertebral (que aloja en su interior a la médula espinal) se ha dividido de forma imaginaria en cinco regiones: cervical, torácica, lumbar, sacra y coxígea (Figura 1). En la rata, la médula espinal está compuesta de 34 segmentos: 8 cervicales (nombrados C1 a C8), 13 torácicos (T1 a T13), 6 lumbares (L1 a L6), 4 sacrales (S1 a S4) y 3 coxales (C1 a C3). La columna vertebral del humano difiere de la columna de la rata, puesto que en el humano existen solo 8 segmentos cervicales, 12 segmentos torácicos, 5 segmentos lumbares, 5 segmentos sacrales y un segmento coxígeo, teniendo un total de 31 segmentos (figura 1).

Dentro de la columna vertebral, el grosor de la médula espinal varía según la cantidad de fibras que lleven sus tractos, haciendo que la médula espinal presente dos engrosamientos, uno cervical y otro lumbar: 1) A nivel cervical, donde se originan las raíces que constituyen el plexo braquial, la médula espinal se encuentra notablemente aplanada en sentido anteroposterior formando un engrosamiento fusiforme, denominado el engrosamiento cervical, que en roedores y primates se extiende de C5-T1. Este engrosamiento se forma con las raíces de nervios que van a transmitir sensibilidad y acción motora hacia y desde los miembros superiores (brazo, antebrazo y

mano). 2) A nivel torácico inferior y lumbar, en donde se origina el plexo lumbosacro, la médula espinal presenta el engrosamiento lumbar, que abarca desde L2 a L6 en roedores y de L2 a S2 en humanos (L1-S2). Este engrosamiento se forma con las raíces de nervios que permiten transmitir la sensibilidad y acción motora hacia y desde los miembros inferiores (muslo, pierna y pie). En su porción inferior la médula espinal adelgaza rápidamente para terminar en forma de punta de cono formando lo que se conoce como el cono medular. Una fina banda de tejido fibroso conocida como el filum terminale, avanza en medio de la cauda equina (raíces correspondientes a los segmentos lumbares, sacro y coxígeo que corren verticalmente bajo el cono medular) desde la vértebra L1 hasta unirse al periostio del dorso del cóccix. El filum terminale es una prolongación de la piamadre que indica el camino de regresión de la médula espinal y tiene la función de fijar el extremo inferior la médula espinal. Bajo el cono medular y hasta la terminación del saco dural en el borde inferior de S2, el espacio subaracnoideo sólo contiene la cauda equina y al filum terminale flotando en líquido cefalorraquídeo (LCFR o cerebrospinal). En su parte superior, la médula espinal se encuentra en continuidad con el bulbo raquídeo, está fijada a éste en su parte media a través de prolongaciones conjuntivas para adherirse a la duramadre (Watson, et al., 2009).

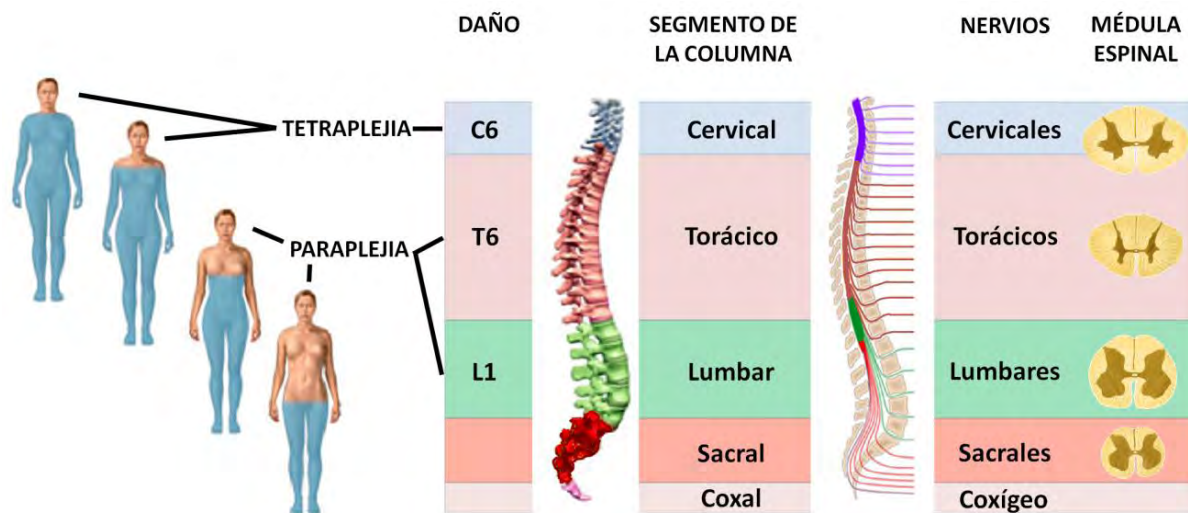


Figura 1. Organización de la columna vertebral y de los nervios espinales. En el lado izquierdo se muestran las regiones del cuerpo afectadas después de una lesión en alguna región de la médula espinal (recuadros de color C6, T6 y L1). En la parte central se muestran las 5 regiones de la columna vertebral. A la derecha se aprecia la división de los nervios espinales y esquemas de cortes transversales de la región cervical, torácica, lumbar y sacra de la médula espinal, mostrando la distribución de la materia gris y blanca (ver figura 2) en el interior de la médula.

En total, de la médula espinal salen 31 pares de nervios, que son los que le brindan un aspecto segmentado: 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coxígeo (figura 1). Todos los nervios espinales derivados de los segmentos torácico, lumbar y sacral de la médula espinal, salen en sentido caudal al canal vertebral de su respectiva vértebra, por ejemplo, el nervio T5 sale caudal a la vértebra T5. La situación es ligeramente más complicada en el segmento cervical, pero solo en 7 vertebras. Una nomenclatura arbitraria resulta en la siguiente división: de C1 a C7, los nervios emergen arriba de su respectiva vértebra y el nervio C8 sale entre C7 y T1 (Watson, et al., 2009).

Al igual que el encéfalo, la médula espinal se encuentra cubierta por membranas llamadas meninges, en total tres: la piamadre, la aracnoides y la duramadre. Del exterior hacia la médula espinal, se encuentra primero la duramadre, que es una membrana fuerte, densa y fibrosa que envuelve a la médula a lo largo de todo el SNC, le sigue la aracnoides, que es una membrana delgada e impermeable y finalmente cubriendo íntimamente y en su totalidad a la médula espinal, se encuentra la piamadre. Entre la piamadre y la aracnoides existe un espacio conocido como espacio subaracnoideo, en el cual se encuentra el LCFR (figura 2A). Este espacio es atravesado por finas trabéculas aracnoideas que se unen a la piamadre (Guyton, 1994; Watson, et al., 2009).

En un corte transversal de la médula espinal se pueden apreciar cuatro caras: una anterior o ventral, dos laterales y una posterior o dorsal. La cara ventral presenta en la línea media la fisura media ventral y limita lateralmente por los surcos ventrolaterales, que la separa de las caras laterales y que son los orígenes aparentes de las raíces nerviosas motoras o eferentes de los nervios espinales. Así mismo, la superficie dorsal en la parte media presenta el surco medial dorsal. En la parte lateral de la médula espinal, se encuentra el funículo lateral, que limita con los surcos ventrolaterales y dorsolaterales, que corresponden al origen de las raíces ventrales y dorsales respectivamente. La médula espinal está compuesta por la materia blanca y la materia gris, la vista transversal de la médula espinal muestra la organización de ambas materias en el interior de la médula (figura 2B). La materia gris se encuentra arreglada en forma de mariposa o de "H", dependiendo del nivel al que se observe. La unión de la "H", llamada materia gris comisural encierra el canal central. Las proyecciones dorsales de los brazos de la materia gris son llamadas astas dorsales y las proyecciones de los brazos ventrales son llamadas astas ventrales (Figura 2B). La materia gris que une a las astas dorsales y ventrales es conocida como materia gris intermediolateral, ésta contiene las células que originan el sistema nervioso autónomo. En la

región torácica esta parte de la materia gris contiene neuronas simpáticas preganglionares. La materia blanca está formada principalmente de axones que viajan longitudinalmente a lo largo de la médula espinal y de células gliales. Como anteriormente se mencionó, las astas de la materia gris dividen a la materia blanca en tres funículos (un gran grupo de axones, los cuales se localizan en una determinada área, reciben el nombre de funículo): dorsal, ventral y lateral. La distribución transversal de la materia gris y blanca varía de acuerdo con la región de la médula espinal (figura 1).

La sangre de la médula espinal es suministrada por una sola arteria ventral y dos dorsales. La arteria espinal ventral se origina de la arteria vertebral y desciende dentro de la fisura medial ventral. Ambas arterias espinales dorsales se originan de la arteria vertebral y descienden por el surco dorsolateral de la médula espinal (Watson, et al., 2009).

En el asta lateral de la médula espinal se encuentran los cuerpos celulares de las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo y sus fibras atraviesan la raíz ventral de la médula espinal hasta el correspondiente nervio raquídeo (nervio mixto que consta de una raíz ventral motora y una dorsal sensitiva). Otro aspecto de suma importancia en el arreglo celular de la médula espinal, es la existencia de interneuronas que sirven de conexión entre las fibras motoras y sensoriales, lo que permite la realización de respuestas reflejas que no necesitan ser ordenadas por los centros cerebrales.

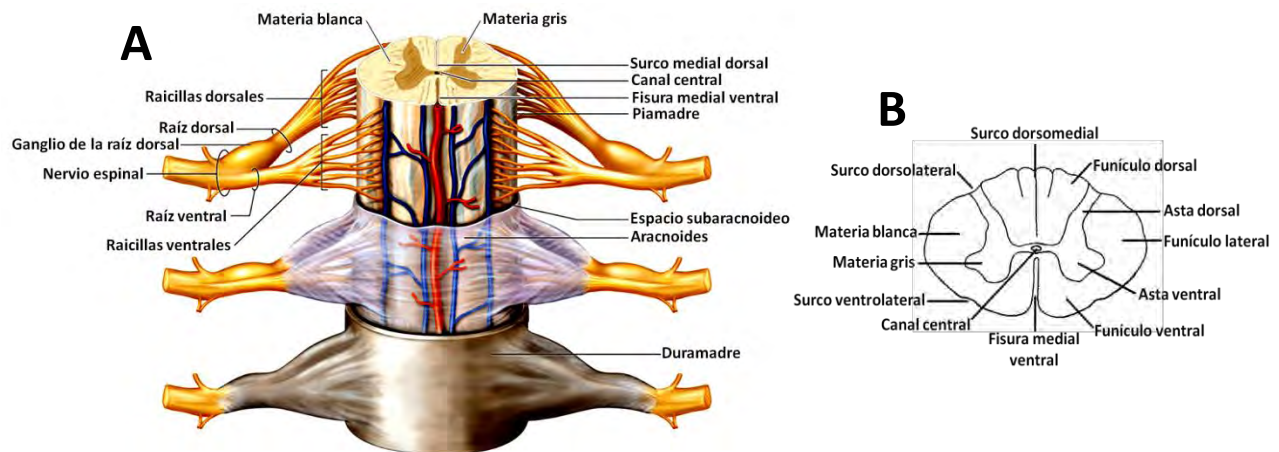


Figura 2. Anatomía de la médula espinal. A) Esquema de la médula espinal en donde se muestran las inervaciones de los nervios espinales dorsales y ventrales, así como las tres meninges que cubren a la médula espinal. En B se indican en un corte transversal los diferentes funículos y surcos que conforman a la médula espinal.

Las motoneuronas (MNs) se encuentran ubicadas en el asta ventral de la sustancia gris a lo largo de toda la médula espinal. Funcionalmente, podemos encontrar dos tipos de MNs: somáticas y viscerales. Las MNs somáticas inervan a los músculos esqueléticos, mientras que las viscerales a las vísceras.

Las MNs somáticas se pueden dividir según su tamaño: Las MNs alfa, que dan origen a las fibras nerviosas alfa, las cuales varían entre 10 y 20 μm de diámetro e inervan las grandes fibras extrafusales del músculo esquelético; el segundo tipo de MNs que podemos encontrar son las gamma, que se encuentra ubicadas junto a las MNs alfa, este tipo de MNs transmiten sus impulsos a través de las fibras tipo gamma de un diámetro de 5 μm a fibras musculares muy pequeñas denominadas intrafusulares, que forman parte del uso muscular. Existe un tercer grupo de MNs denominadas beta, estas envían sus proyecciones dentro del músculo a fibras intrafusales y extrafusales, además inervan principalmente a músculos distales y extremidades.

Las interneuronas se encuentran presentes en todas las áreas del SNC, en la sustancia gris de la médula espinal, son 60 veces más numerosas que las MNs, son de menor tamaño y muy excitables, tienen numerosas interconexiones y muchas de ellas inervan a las MNs ventrales. En la médula espinal, las interneuronas más conocidas son las células de Renshaw, las cuales se encuentran en íntima relación con las MNs y son de tipo inhibitorio (Álvarez y Fyfee, 2007; Brodal, 1998).

Principales circuitos neuronales de inhibición y excitación en la médula espinal.

El funcionamiento adecuado del SNC de un organismo, se basa en un equilibrio constante, pero dinámico de su actividad, la cual está controlada principalmente por la interacción de dos circuitos neuronales principales, el excitador y el inhibidor. Al igual que en todo el SNC, en la médula espinal el sistema excitatorio es controlado principalmente por el neurotransmisor (NT) glutamato (Glu); y para los circuitos inhibitorios son los NTs GABA y glicina (Gly). Ambos circuitos (excitatorio e inhibitorio) coexisten en un delicado equilibrio regulando diversos procesos en el SNC. Una pequeña alteración en este estrecho equilibrio, puede servir como inductor de diversas patologías. Por ejemplo, una falla o disminución de la actividad GABAérgica, o por el contrario, el incremento en la actividad de las sinapsis excitatorias, pueden generar de igual manera una sobreexcitación neuronal, que en ocasiones, puede verse reflejada con la aparición de crisis convulsivas (Foster y Kemp, 2006).

Inhibición: GABA y glicina

En la médula espinal los circuitos inhibitorios son controlados principalmente por el GABA y la glicina. Cada uno de estos NTs activa un receptor-canal de cloro sensible a ligando perteneciente a la superfamilia de canales de iones con topología pentamérica, dentro de la cual el receptor nicotínico para acetilcolina es el receptor canal prototipo. Otros miembros de esta superfamilia de receptores-canal son el receptor tipo 3 para serotonina (5-HT₃), receptores para GABA tipo C (GABAC) y recientemente identificados los receptores de unión a Zinc y GABA permeables a cationes (Begg y Jorgensen, 2003; Davies, et al., 2003; Lynch, 2004, 2009).

El principal receptor postsináptico para el GABA es conocido como tipo A o GABA_A (Foster y Kemp, 2006), mientras que el de Gly es conocido solamente como receptor para glicina (GlyR; Curtis, et al., 1967; Lynch, 2009; Werman, et al., 1967). En las terminales GABAérgicas los receptores GABA_A (GABAARs) se encuentran alrededor y en contacto con el cuerpo celular de las MNs y de las dendritas proximales (Carlton y Hayes 1990; Holstege y Calhoen, 1990; Magoul, et al., 1987, McLaughlin, et al., 1975; Mugnaini y Oertel, 1985). El GABA y sus receptores están presentes en la densidad sináptica de las MNs lumbares y cervicales (Destombes, et al., 1996; Murphy, et al., 1996; Örnung, et al., 1994, 1996, 1998; Ramirez-Leon y Ulfhake, 1993; Sur, et al., 1995) y en un menor porcentaje en sitios extrasinápticos (Sur, et al., 1995).

El GABAAR es un complejo molecular integrado como heteropentámero de peso aproximado entre 275 a 400 kDa (Hevers y Luddens, 1998; Macdonald y Olsen, 1994; Sieghart, et al., 1999). Las subunidades que lo forman se denominan con las letras griegas: alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ) épsilon (ϵ), rho (ρ) y theta (θ); además, es posible distinguir diversos subtipos de estas subunidades: 6 diferentes subtipos de α ; 3 distintas β , 3 tipos de γ , 1 forma de δ , 1 de tipo ϵ , 3 formas de ρ y un solo tipo de θ (Kardos, 1999; Chebib y Johnston, 1999). Cada subunidad tiene su dominio N-terminal del lado extracelular, el cual puede ser el sitio de ligado de varias moléculas, las cuales pueden modular la actividad del ligando GABA. En la médula espinal, la combinación de subunidades del GABAAR más frecuente es $\alpha_2\gamma_2$ ó $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ en una estequiometría aún desconocida (Foster y Kemp, 2006; De Blas, 1996).

Los GlyRs funcionales están formados por un total de cinco subunidades, que pueden ser: α_1-4 (48 kDa) y β (58 kDa). Algunos autores asocian a la gefirina como parte de los GlyRs (Pfeiffer, 1982; Lynch, 2009), la gefirina es una proteína encargada de anclar a lo GlyRs al citoesqueleto. Numerosas evidencias bioquímicas, biofísicas y farmacológicas sugieren que la mayor conformación de subunidades del GlyRs en el estado adulto está formada como un

heteropentámero de las subunidades $\alpha 1\beta$. En la mayoría de las MNs espinales, los transcritos para las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son localizados en el soma y en las dendritas, mientras que los transcritos para la subunidad β y gefirina, se restringen al soma (Rekling, et al., 2000).

Los receptores para glicina (GlyRs; Lengendre, 2001) y los receptores GABA_A (GABAARs; Macdonald y Olsen, 1994), se acumulan en los sitios postsinápticos para permitir una neurotransmisión inhibitoria rápida y eficaz. La agregación y estabilización postsináptica de los GlyRs y los GABAARs requiere de su interacción con proteínas de anclaje intracelulares, que son parte de un complejo multiproteico de anclaje subsináptico ligado al citoesqueleto (Legendre, 2001). Estos receptores son propensos a mostrar diferentes propiedades funcionales de acuerdo a su distribución subcelular. Durante la sinaptogénesis e incluso en el adulto, se localizan tanto en sitios postsinápticos como extrasinápticos (Sibilla y Ballerini, 2009). Actualmente se conoce que los receptores postsinápticos, son los responsables de una neurotransmisión rápida y fásica, mientras que la activación de los receptores extrasinápticos está implicada en la modulación lenta y tónica de la actividad de neuronal.

La acumulación sináptica de los GABAARs y GlyRs depende de su habilidad para unirse a la gefirina (Tretter, et al., 2008), la cual es una proteína periférica de membrana (Schmitt, et al., 1987) encargada de anclar a los GlyRs ó los GABAARs con los componentes microtubulares subyacentes del citoesqueleto (Prior, et al., 1992) mediante un puente. Grandes agrupamientos de gefirina han sido correlacionados con grandes corrientes postsinápticas inhibitorias (Lim, et al., 2000; Oleskevich, et al., 1999; Geiman, et al., 2002). El hecho de que la gefirina se una a los GlyRs y a los GABAARs, y promueva el agrupamiento de los mismos, hace necesario que la gefirina, los GlyRs y los GABAARs se encuentren juntos en los sitios postsinápticos (Bohlhalter, et al., 1994; Todd, et al., 1996; Triller, et al., 1987), lo que sugiere que la Gly y el GABA pueden actuar como cotransmisores en las sinapsis inhibitorias de MNs (Örnung, et al., 1994, 1996, 1998; Todd, et al., 1996; Singer y Berger, 2000; Shupliakov, et al., 1993, Taal y Holstege, 1994). En la médula espinal y en varias áreas del tronco cerebral, el GABA y la Gly pueden ser coliberadas desde la misma terminal presináptica. En la médula espinal GABA y Gly se encuentran continuamente colocalizadas en terminales de interneuronas inhibitorias premotoras (Dumba, 2000; Lahjouji, et al., 1996; Örnung, et al., 1994, 1996; Taal y Holstege, 1994; Turman y Chandler, 1994; Wentzel, et al., 1993), en donde son ingresados a las vesículas presinápticas por el mismo transportador (Burger, et al., 1991). De forma interesante, la coactivación de GABAARs y GlyRs en sinapsis inhibitorias mixtas, no se limita a mostrar una suma de las corrientes mediadas por ambos tipos

de receptores, resultando de una comunicación cruzada entre estos receptores postsinápticos coagregados (Donato y Nistri, 2001).

La proporción de sinapsis GABAérgicas y glicinérgicas en la médula espinal, varía dependiendo del estado de madurez del organismo: Jonas y colaboradores (1998), estiman que de los eventos cuánticos registrados en las MNs de ratas del día posnatal 5-10, aproximadamente, 44% corresponden a un componente dual (GABA y Gly), 41% solo a Gly y el 17% únicamente a GABA. Interesantemente, Gao y Ziskind-Conhaim (2001, 1995), demostraron que el número de sinapsis puras para GABA o Gly varían probablemente durante un desarrollo posnatal temprano, mientras que el número de sinapsis mixtas se mantiene constante: En MNs de ratas embrionarias (E17-18), 60% son eventos únicamente GABAérgicos, 20 % glicinérgicos y 20% mixtos. Sin embargo, después de nacer (P1-3), los porcentajes son: 60 % glicinérgicos, 20 % GABAérgicos y 20 mixtos (Gao, et al., 2001; Singer y Berger, 2000).

El papel funcional que desempeñan cada uno de estos NTs inhibitorios en el control de la actividad neuronal de la médula espinal, ha sido un tema muy controversial. Actualmente no se conoce con certeza el papel exacto de cada uno de estos dos sistemas, sin embargo se han realizado trabajos que permiten hacer aproximaciones sobre este tema.

Se ha demostrado que la actividad de GABA y Gly durante el desarrollo de los organismos es de tipo excitatorio, la cual resulta de suma importancia para el desarrollo y maduración de las redes neuronales, quienes utilizan las despolarizaciones causadas por ambas neurotransmisiones para dirigir su crecimiento. La expresión de GABAARs y de GlyRs en la medula espinal embrionaria y neonatal, puede desempeñar una función trófica en la diferenciación neuronal y en la sinaptogénesis (Meier, et. al., 1991; Reikling, et. al., 2000. Singer y Berger, 2000). Las sinapsis GABAérgicas y Glicinérgicas actúan como terminales despolarizantes durante la maduración neuronal en roedores, desde el periodo embrionario hasta el postnatal temprano, son capaces de elevar la concentración intracelular de calcio, y en estado prenatal, pueden inducir potenciales de acción (Ben-Ari et al., 1989; Reichling et al., 1994; Obrietan y van den Pol, 1995), además, GABA y Gly generan generan señales de despolarización en neuronas embrionarias y postnatales tempranas, liberando altas concentraciones intracelulares de cloro (Ben-Ari et al., 2007).

En organismos adultos GABA y Gly median la inhibición postsináptica de la actividad de las MNs. También contribuyen significativamente a la generación de patrones rítmicos, incluyendo la respiración (Merrill y Fedorko, 1984), locomoción (Cazalets, et. al., 1996; Hochman, et. al., 1994; Kjaerulff y Kiehn, 1997; Perret, 1983), masticación (Chandler, et. al., 1985; Enomoto, et. al. 1987;

Inoue, et. al., 1994) y la deglución (Bieger, 1991). En estos patrones, la actividad de las MNs es caracterizada por fases secuenciales de excitación e inhibición. El control inhibitorio sináptico de la excitabilidad durante la fase activa puede afectar el tiempo de inicio y final de los bursts o ráfagas de potenciales de acción afectando el inicio de la contracción y relajación muscular, patrones de disparo celular y el orden del reclutamiento celular (Parkis, et. al., 1999; Rekling, et. al., 2000; Robertson y Stein, 1988; Withington-Wray, et. al., 1988; Woch y Kubin, 1995).

Registros de la actividad espinal en el ratón, indican que la transmisión glicinérgica favorece la propagación episódica a través de segmentos espinales contiguos, mientras que la generación de la actividad sináptica a nivel local se basa en redes neuronales formadas por MNs e interneuronas GABAérgicas (Hanson y Landmesser, 2003; Moody y Bosma, 2005).

El tipo de interneurona espinal inhibitoria mejor estudiada es la llamada célula de Renshaw (CR). Identificada por primera vez en la médula espinal de gato adulto por Renshaw (1946). Estas células reciben aferencias nicotínicas y glutamatérgicas directamente de las neuronas motoras (Mentis, et. al., 2005; Nishimaru, et. al., 2005) y hacen predominantemente proyecciones glicinérgicas hacia las MNs (Goulding, et. al., 2002). Se ha sugerido que la inhibición aportada por las CRs ocurre a partir de la maduración de sus sinapsis. Tales sinapsis inhibitorias maduran posnatalmente desarrollando grandes agregados postsinápticos de gefirina (proteína asociada con el anclaje de GABA_Rs y Gly_Rs) que colocalizan con GABA_ARs y Gly_Rs (González-Forero y Álvarez, 2005).

Excitación: Glutamato

El ácido glutámico o Glu es el principal NT excitador de acción rápida en el SNC de los mamíferos (Collingridge y Lester, 1989; Monaghan, et. al., 1989; Nakanishi, 1992). La potente acción excitatoria del Glu en neuronas del SNC, fue reportada por primera vez en 1960 en neuronas sensoriales y MNs de la médula espinal de gato. Existen tres principales receptores postsinápticos de tipo ionotrópico que median la respuesta rápida al Glu mediante la apertura o cierre de un canal para iones, estos receptores se encuentran conformados por cinco subunidades. Dichos receptores se han clasificado con base en sus propiedades farmacológicas y funcionales, los tres tipos de receptores son: 1) alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol- ácido propiónico o AMPA, compuesto por subunidades Glu_R de la 1-4; 2) Receptores Kainato, compuesto por las subunidades Glu_R 5-7, KA1 y KA2; y 3) Receptores N-metil-D-aspartato o NMDA, compuesto por

las subunidades NMDAR1, NMDAR2A-D y NMDAR3A (Bettler y Mülle, 1995; Dingledine, et. al., 1999; Michaelis, 1998; Schoepfer, et. al., 1994; Seeburg, 1993a y b).

La acción del Glu se ha visto relacionada con diversos aspectos de la función normal del cerebro, tales como: la cognición, memoria y aprendizaje, así como en sinaptogénesis, organización de los circuitos neuronales, plasticidad sináptica, migración celular y diferenciación celular. Sin embargo, la sobreestimulación de los receptores postsinápticos ionotrópicos para Glu puede inducir un proceso degenerativo, ya que genera una hiperexcitación de las neuronas a causa una despolarización, la cual permite un influjo masivo de calcio en las neuronas, induciendo la activación descontrolada de procesos deletéreos que eventualmente causan la destrucción de la membrana y finalmente la muerte celular (Arundine y Tymianski, 2003). Este fenómeno parece ocurrir después de una amplia gama de daños neurológicos, como: el accidente cerebro vascular (anoxia-isquemia), trauma, epilepsia y además parecen estar relacionados con varios trastornos neurodegenerativos, tales como: la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA; Lipton y Rosenberg, 1994; Meldrum, 2000)

Los tres tipos de receptores ionotrópicos para Glu (AMPA, KA y NMDA) han sido identificados en las MNs, y su abundancia relativa se ha tratado de determinar mediante diferentes técnicas. Sin embargo, no se ha logrado en su totalidad. Actualmente los datos disponibles indican que la abundancia de estos receptores en la médula espinal de rata es (ordenada de mayor a menor): AMPA, NMDA y KA (Fukuyama, et. al., 1993; Tolle, et. al., 1993); y en conejos AMPA, KA y NMDA (Bonnot, et. al., 1996). Actualmente se sabe que la entrada de calcio en MNs de la médula espinal es principalmente mediada por el receptor para Glu de tipo AMPA, el cual provoca una sinapsis excitatoria rápida (Corona, et al., 2007).

Se conoce que la presencia de la subunidad GluR2 en los receptores AMPA determina su permeabilidad a calcio. El papel de la subunidad GluR2 para determinar la permeabilidad a calcio, no sólo depende de su presencia o ausencia (sin GluR2, los receptores son permeables a calcio; Hume, et. al., 1991; Hollman, et. al., 1991), sino también de modificaciones post-transcripcionales del RNAm de esta subunidad, esto es debido a la edición de un sitio Q/R presente en el segundo dominio transmembranal. Cuando la glutamina (Q) no es editada, los receptores resultan ser permeables a calcio, sin embargo, al cambiarse la glutamina por arginina (R), los receptores resultan ser impermeables a calcio (Corona, et. al., 2007; Burnashev, et. al., 1992).

Las señales motoras se comunican a las MNs espinales desde la corteza motora a través del tracto corticoespinal. Aunque todos los mamíferos poseen esta estructura, existen variaciones

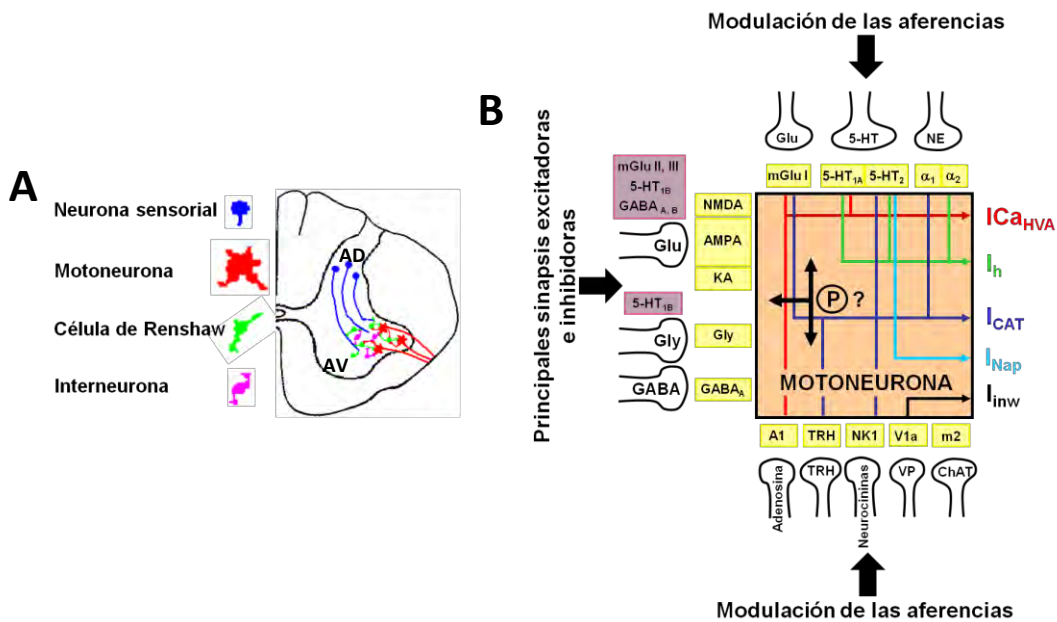
considerables en la posición del tracto en la médula espinal (Watson y Harvey, 2009). En los roedores esta estructura se ubica en la columna dorsal (Brown, 1971; Elger et al., 1977), y en los primates se encuentra en la columna lateral (Petras, 1969). En primates, la mayor proporción de las fibras del tracto corticoespinal provienen directamente de la corteza motora (Nudo y Masterton, 1900a, b), mientras que en mamíferos más primitivos las fibras provienen de la corteza sensorimotora (Lender, 1963) ya que en éstos, la corteza motora como tal no es una región bien definida (Watson y Hervey, 2009). Las fibras que originan el tracto corticoespinal en los mamíferos adultos se derivan de neuronas piramidales de la capa 5 de las áreas corticales motora, premotora y somatosensorial (Watson y Hervey, 2009).

La inervación glutamatérgica del tracto corticoespinal a las MNs espinales se ha demostrado a través de diversos medios. Por ejemplo, en el inicio de la locomoción se ha probado in vitro la participación de aminoácidos excitadores (Jordan et al., 2008), y se ha demostrado que la administración intratecal de antagonistas glutamatérgicos bloquea la locomoción inducida por la estimulación eléctrica de la región locomotora mesencefálica del cerebro medio del gato (Douglas et al., 1993). De la misma manera, la administración de NMDA induce el inicio de la locomoción en gatos (Chau et al., 2002). En la rata también se ha demostrado que la estimulación eléctrica del funículo dorsal, que contiene axones corticoespinales descendientes, desencadena potenciales postsinápticos excitadores, que son bloqueados con CNQX, un antagonista de receptores glutamatérgicos del tipo no-NMDA (Hori et al., 2002). Además de las inervaciones glutamatérgicas del tracto corticoespinal y de las fibras sensitivas, cuya acción no necesariamente involucra el paso por el cerebro, existe un grupo de interneuronas en la materia gris de la médula espinal capaces de liberar glutamato. Estas interneuronas glutamatérgicas se encuentran en estrecha relación con las MNs y se han asociado con la formación y control de la actividad de los circuitos premotores (Hägglund, et. al., 2010).

La acción del Glu en la médula espinal puede estudiarse en diferentes niveles de organización, puesto que puede ser vista desde el control de la actividad de las MNs (en circuitos locales formados por interneuronas excitatorias; Hägglund, et. al., 2010), así como en su importancia y papel en la inducción y mantenimiento de patrones de actividad, tales como: la masticación, respiración y patrones de locomoción. Actualmente se tienen acercamientos sobre el papel que pueden tener las sinapsis excitatorias dependientes de Glu, tratando de discernir entre el papel de cada tipo de receptor para Glu (AMPA/KA y NMDA), dejando como aportación que: los NMDARs, son los responsables de generar una actividad fásica en las MNs y que su

sobreactivación induce la aparición de “bursts” (ráfagas de potenciales de acción). Por otro lado, los AMPARs se han visto involucrados en mantener una actividad tónica, sin que su sobreactivación llegue a generar la aparición de bursts.

A manera de resumen, podemos decir que: las aferencias de las MNs son afectadas por la liberación presináptica de varios transmisores (aminoácidos, aminas, péptidos) que actúan sobre receptores postsinápticos, varios de estos transmisores también pueden afectar vías de señalización por acción en sus receptores presinápticos. El efecto integral de estos transmisores actuando sobre sus receptores, en conjunto con las propiedades intrínsecas de las MNs determina la generación de señales eferentes, propagación de potenciales de acción a través de las fibras nerviosas motoras periféricas y colaterales recurrentes (Figura 3).



AD: Asta dorsal. **AV:** Asta ventral. **ICaHVA:** Corrientes activadas por voltaje y entrada de iones Ca^{2+} . **I_h:** Corriente de entrada activada por hiperpolarización (iones K^+ y Na^+). **I_{Kleak}:** Corriente de fuga de K^+ . **I_{Nap}:** Corriente de Na^+ persistente. **I_{inw}:** Corriente hacia el interior dependiente de sodio. Para otras abreviaturas revisar el texto.

Figura 3. Principales circuitos neuronales de la médula espinal. A) Esquema de las redes neuronales locales en la médula espinal. B) Esquema representativo de las principales aferencias de las MNs. Los NTs se indican en cada terminal presináptica, así como sus receptores presinápticos (rectángulos rosas) y postsinápticos (rectángulos amarillos). Estos sistemas de transmisores pueden actuar de manera conjunta y converger en sus efectos finales, por ejemplo induciendo las siguientes corrientes: $ICaHVA$, I_h y I_{Kleak}/CAT . Aunque en este esquema algunos NTs estén separados, pueden colocalizarse en las mismas terminales, como el caso de GABA y Gly. P? indica que algunos receptores pueden ser fosforilados o bien alguna de sus proteínas asociadas.

La integración de estas eferencias es compleja, la acción de receptores ionotrópicos induce (o reduce) flujos de corriente localizados, que se propagan de acuerdo a las propiedades

de la membrana y la morfología celular. Acciones en receptores metabotrópicos (no descritos por fines prácticos) inician cascadas de segundos mensajeros que tienen efectos múltiples, incluyendo alteraciones de los canales o de la funcionalidad de los receptores. Muchas de estas acciones son convergentes, puesto que en ocasiones actúan utilizando los mismos mecanismos de transducción de señales, o afectando el mismo blanco, tal como un tipo específico de canal. De igual manera estas sinapsis pueden ser moduladas por la acción de NTs como la serotonina (5-HT) y la norepinefrina (NE), y también por la acción de neuromoduladores tales como la hormona liberadora de tirotrina (TRH, por sus siglas en inglés), adenosina, neurocininas (como la sustancia P), la vasopresina (VP, también llamada hormona antidiurética) e inclusive por la acción de pequeñas interneuronas colinérgicas, que tienen acción sobre los receptores muscarínicos tipo 2 (m2) de las MNs espinales (Zagoraïou, et. al., 2009), figura 3.

Patologías relacionadas con la médula espinal.

La médula espinal al igual que cualquier otro órgano del cuerpo es susceptible a padecer diversas enfermedades. En el caso de la médula espinal, las patologías más comunes son: la poliomielitis, el síndrome de cola de caballo, la siringomielia, y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La poliomielitis es una enfermedad causada por un poliovirus. En humanos, la infección es iniciada por ingestión oral del virus, seguido por su multiplicación en la mucosa alimentaria, desde la cual se dispersa a través del torrente sanguíneo. Existen diversos tipos de poliomielitis: la poliomielitis parálisis bulbar, la polioencefalitis, y la poliomielitis parálisis. La poliomielitis parálisis que es la más conocida, inicia desde la invasión al SNC por los poliovirus circulantes en la sangre, probablemente por vía de la barrera hematoencefálica. Después de su entrada al SNC, el virus se replica en neuronas, específicamente en las MNs, provocando la muerte de las MNs y causando la poliomielitis parálisis (Ohka, 2009). Esta destrucción de las MNs provoca debilidad muscular y parálisis aguda flácida. La forma de combatir esta enfermedad es mediante el uso de vacunas.

El síndrome de cola de caballo es un trastorno neurológico raro, es la combinación de signos y síntomas derivados de la lesión de los nervios de la cauda equina. Algunas manifestaciones típicas pueden ser asociadas con dolor de la espalda baja, dolor unilateral o usualmente bilateral de la ciática, debilidad bilateral de las extremidades inferiores, anestesia o hipoestesia perianal, impotencia sexual, así como disfunción del esfínter rectal y vesical. Sin embargo, sus mecanismos histopatológicos no son comprendidos en su totalidad, puesto que

puede ser consecuencia de cualquier lesión en las raíces de los nervios de la cauda equina, por ejemplo: una compresión mecánica directa, la inflamación y la congestión venosa o isquemia (Scott, 1965; Kostuik, et. al., 1986). Existen varias opciones terapéuticas para los pacientes con este desorden. Dos tratamientos conservadores han sido reportados: uno de ellos es el empleo de antiinflamatorios y el segundo a través de vasodilatadores (Orendáková et. al., 2001). Actualmente existe una operación, mediante la cual existe la posibilidad de disminuir la presión sobre los nervios de la cauda equina, sin embargo, si la cirugía no se realiza de forma temprana (a la fecha, ningún estudio ha demostrado de manera convincente cual es el mejor tiempo de descompresión de los nervios afectados en el síndrome de la cola de caballo) se puede perder la función por debajo de la cintura (Ma, et. al., 2009).

La siringomielia es un trastorno en el cual se forma un quiste dentro de la médula espinal. Este quiste se conoce como siringe o syrinx, que con el tiempo se expande y se alarga destruyendo el centro de la médula espinal. Puesto que la médula espinal conecta el cerebro con los nervios de las extremidades, este daño causa dolores, debilidad y rigidez en la espalda, hombros, brazos o piernas. Otros síntomas pueden incluir dolores de cabeza y pérdida de la capacidad de sentir calor o frío extremos, especialmente en las manos. Cada paciente tiene una combinación distinta de síntomas. El tratamiento más usual para este padecimiento es la cirugía, en casos en donde el syrinx es un tumor puede tratarse con radioterapia (Feske y Cochrane, 2007).

En el presente proyecto, la ELA es uno de los puntos de mayor importancia debido a que los modelos experimentales *in vivo* utilizados en esta investigación, están diseñados para facilitar el estudio y comprensión de esta devastadora enfermedad neurodegenerativa, por lo cual el siguiente apartado se enfoca específicamente a su descripción.

ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La ELA o también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, fue descrita por primera vez en 1869 por Jean Martin Charcot. Es una enfermedad neurodegenerativa devastadora, caracterizada por la pérdida progresiva de las neuronas motoras superiores e inferiores, lo cual produce un déficit motor progresivo. Existen dos tipos de ELA, la familiar y la esporádica, aunque los síntomas de ambos tipos son prácticamente idénticos, la única diferencia es el patrón genético asociado con la ELA de tipo familiar.

La proporción de casos de ELA del tipo familiar ocupa apenas el 10%, y los casos de ELA del tipo esporádica ocupan el 90%. Dentro de los casos de la ELA familiar, sólo el 15-20% se asocia

con una mutación en la superóxido dismutasa I (Rosen, et. al., 1993). Para los casos de ELA esporádica, hasta la fecha se desconocen las causas y mecanismos que la provocan. La característica histopatológica de la ELA es la muerte selectiva de las MNs localizadas en las astas ventrales de la médula espinal, del tallo cerebral y de la corteza cerebral motora. Los síntomas iniciales en ambos tipos de ELA, dependen del tipo de MN que es afectado primero, teniendo dos posibles orígenes: 1) el origen de tipo bulbar (25% de los casos), caracterizado por la presencia de disfagia y disartria progresiva, espasticidad e hiperreflexia; y 2) el origen espinal (75% de los casos), caracterizado por la presencia de calambres, debilidad y atrofia muscular, espasticidad y parálisis (Mulder, et. al., 1986). Debido a que la pérdida neuronal en la ELA es selectiva, afectando únicamente a las MNs, generalmente no causa deterioros cognitivos mayores, como es el caso de otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y la de Huntington. Sin embargo, algunos pacientes con ELA llegan a presentar cambios de su personalidad, irritabilidad y obsesión (Phukan, et. al., 2007). Generalmente los pacientes mueren a causa de una falla respiratoria después de 3 a 5 años del diagnóstico (sin embargo existen casos excepcionales como el del cosmólogo y físico Stephen Hawking, quien desde los 21 años fue diagnosticado con ELA y actualmente tiene 68 años). La prevalencia mundial de la ELA es de 2-8 en 100 000 individuos y su aparición suele asociarse con la edad, teniendo como punto de inicio la edad adulta media (55 años), aunque puede comenzar en etapas más tempranas (Chancellor y Warlow, 1992; Corona, et. al., 2007). Existe un grupo diferente de MNs somáticas que no es afectado por la ELA. Estas células se ubican en el núcleo de Onuf, en la parte ventrolateral del asta ventral de la región caudal lumbar y rostral sacral e inervan a los músculos perineales, a los esfínteres anal, uretral y al cremaster (Celio, 1990; Ince, et al., 1993; Siklós, et al., 1998).

El mecanismo propuesto por el cual las MNs mueren en la ELA propone un fenómeno de excitotoxicidad mediado por Glu. Esta hipótesis se basa principalmente en la reducción del contenido de la proteína transportadora de Glu (GLT1) detectada postmortem en la corteza motora y en la médula espinal de pacientes con ELA (Rothstein, et. al., 1992; 1995). Además de esta hipótesis, se han postulado otros mecanismos que podrían estar involucrados, tales como: el mal plegamiento y agregación de proteínas, disfunción mitocondrial, fallas en el transporte axonal, estrés oxidativo, inflamación y apoptosis (Boillée, et. al. 2006; Rowland y Shneider, 2001; Brujin, et. al., 2004; Julien, 2001; Shaw, 2005). Como anteriormente se mencionó, la actividad del Glu y la entrada de Ca^{2+} en las MNs están mediadas por AMPARs permeables a calcio. La sobreactivación de este receptor resulta en una hiperexcitabilidad neuronal producida por

despolarización de la membrana celular, esto a su vez permite un influjo masivo de Ca^{2+} , induciendo la activación descontrolada de procesos deletéreos que eventualmente producen daño y destrucción de la membrana y finalmente la muerte de las células (Corona, et. al., 2007). Las MNs son muy vulnerables al incremento de calcio, debido a su baja cantidad de proteínas amortiguadoras de calcio en su citoplasma, lo cual provoca una baja capacidad de amortiguar los cambios en la concentración de este catión (Alexianu, et. al., 1994; Celio, 1990; Ince, et. al., 1993; Palecek, et. al., 1999).

El único tratamiento aprobado actualmente para la ELA es el Riluzol, el cual es un compuesto que pertenece a la familia de los benzotiazoles, su efecto protector incluye varios procesos pre y postsinápticos, como la inhibición de la liberación de Glu (Martin, et. al., 1993), bloqueo de los receptores de aminoácidos excitadores en los cuerpos celulares, inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje en terminales y cuerpos celulares y la estimulación de una vía de transducción de señales dependiente de la proteína G (Doble, 1996).

El uso de modelos experimentales (tanto *in vivo*, como *in vitro*) para el estudio de diversas enfermedades, ha permitido realizar grandes avances en el entendimiento y manejo de diversas patologías. Para la ELA se han desarrollado diversos modelos de estudio. A continuación mencionaremos brevemente algunos de estos modelos experimentales.

Modelos experimentales para el estudio de la ELA.

Las principales características histopatológicas y los conocimientos que se tienen sobre la ELA han sido empleados para el desarrollo de diversos modelos experimentales. En condiciones *in vitro* se han desarrollado cultivos celulares de MNs (Atkin, et. al., 2006; Cozzolino, et. al., 2008; Rizzardini, et. al., 2005), cultivos organotípicos (Corse, et. al., 1999; Rothstein, et. al., 2005; Tolosa, et. al., 2008) y diversas preparaciones de médula espinal aislada (Jiang y Heckman, 2006; Jiang, et al., 2009). Por otra parte *in vivo*: se han generado líneas transgénicas que desarrollan esta enfermedad (ratones y ratas que abarcan únicamente al tipo familiar) y modelos farmacológicos con los que los animales sanos desarrollan la principal característica histopatológica de la ELA, la pérdida de MNs (Tovar-y-Romo, et al., 2007).

En los modelos *in vitro*, mantener poblaciones constantes de neuronas en cultivos representa un gran reto, puesto que su condición de células diferenciadas con su nula capacidad de proliferación hace difícil esta tarea. Sin embargo, a través de híbridos celulares (células de neuroblastoma y MNs espinales, con los que se generan las células NSC-34), se ha logrado

solucionar este problema. La línea celular NSC-34, que expresa la SOD1 mutada de humano, se considera un modelo de ELA. Aspectos importantes de estas células son que preservan la síntesis, almacenaje y liberación de acetilcolina, generación de potenciales de acción, expresión de neurofilamentos y glicoproteínas sinapsis-específicas asociadas a la placa neuromuscular. Este modelo ha facilitado el estudio *in vitro* del mecanismo de toxicidad inducido por la SOD1 mutante (Atkin, et. al., 2006; Cozzolino, et. al., 2008; Rizzardini, et. al., 2005) y su relación con la ELA. Una desventaja de este modelo es que al ser cultivos celulares se pierden las diversas interacciones de las MNs con otros tipos celulares, las cuales son de suma importancia en la modulación de la actividad de las MNs. Un modelo *in vitro* que permite mantener tanto a las MNs así como a otros tipos celulares sin afectar sus interacciones, son los cultivos organotípicos. En este modelo, la degeneración de las MNs se ha inducido mediante la exposición crónica de los cultivos al treonina-β-hidroxiaspartato (THA, bloqueador del transportador de Glu; Rothstein, et. al., 2005). Por otro lado, el uso de factores neurotróficos previene la muerte de las MNs (Corse, et. al., 1999; Tolosa, et. al., 2008). EL problema con este modelo es que, como en muchas ocasiones, los resultados obtenidos en modelos *in vitro*, no siempre son reproducibles en sistemas *in vivo*. Otro modelo en el cual los tipos celulares de la médula espinal se conservan en su totalidad sin alteraciones y de igual manera las redes neuronales espinales locales, así como las vías de entrada y salida de la médula espinal, es la preparación de médula espinal aislada (Jiang y Heckman, 2006; Jiang, et al., 2009) la cual mantiene sus propiedades funcionales por periodos de hasta 8 horas. Este modelo ha facilitado el estudio de los cambios fisiológicos de las MNs y sus redes neuronales, durante el progreso de la ELA en el ratón transgénico G93A, el cual desarrolla de manera progresiva esta enfermedad (Jiang et al., 2009).

Con la intención de desarrollar herramientas que ayuden al estudio *in vivo* de la ELA, se han desarrollado líneas transgénicas de ratón, las cuales expresan la SOD1 mutada y en consecuencia desarrollan la ELA. Existen cuatro cepas diferentes: la G93A (sustitución de una glicina por alanina en la posición 93), la A4V (sustitución de alanina por valina en la posición 4; Gurney, et. al, 1994), la G37R (sustitución de glutamato por arginina en la posición 37; Wong, et. al., 1995) y la G85R (sustitución de glutamato por arginina en la posición 85; Bruijn, et. al., 1997). El fenotipo expresado por estos ratones, en cuanto a la edad de inicio y la severidad de la enfermedad, es directamente proporcional al aumento de la proteína mutante expresada en el tejido (Gurney, et. al., 2000). En este modelo de ELA familiar, todas las hipótesis sobre el origen de la ELA, han sido puestas a prueba incluyendo el estrés oxidativo (Harras et. al., 2008; Cookson y

Shaw, 1999; Marden, et. al., 2007), la excitotoxicidad (Tovar-y-Romo y Tapia, 2006; Corona, et. al., 2007), la apoptosis (Wood, et. al., 2003; Dupuis, et. al., 2004; Hervias, et. al., 2006), la agregación proteica (Wood, et. al., 2003), la disfunción axonal (Sasaki, et. al., 2005), la falla mitocondrial (Cassina, et. al., 2008; Dupuis, et. al., 2004 Hervias, et. al., 2006), el estrés del retículo endoplásmico (Kikuchi, et. al., 2006; Nishitoh, et. al., 2008; Kieran, et. al., 2007), y prácticamente cualquier otro mecanismo que se sospeche pueda estar participando. Este modelo también ha sido muy utilizado para la prueba de fármacos y terapias en etapas experimentales. Desafortunadamente, como ya se mencionó, el tipo de ELA familiar, únicamente abarca el 10% de los casos de la ELA.

Actualmente se han desarrollado modelos en los que la muerte de las MNs no ocurre en consecuencia a un factor genético. En estos modelos la pérdida de las MNs se induce mediante tratamientos farmacológicos en organismos completamente sanos. En nuestro laboratorio contamos con dos modelos *in vivo* capaces de inducir la muerte de las MNs espinales. Ambos modelos experimentales utilizan como principio básico la sobreactivación del receptor AMPA. El primero utiliza como medio de administración del AMPA (6 mM) la microdiálisis (Corona y Tapia, 2004, 2008). En este modelo, la pérdida de las MNs lumbares comienza de 3-6 horas después de la perfusión de AMPA y alcanza su máximo punto a las 12-24 horas. La manera de administración del AMPA y el tiempo en el cual induce la muerte de las MNs en el sitio de la perfusión, definen a este modelo como un modelo agudo de degeneración espinal. Sin embargo, su mayor limitación es precisamente la ventana de tiempo en la que se desarrolla la parálisis, en cuestión de horas, ya que la muerte de las MNs en la ELA, es un proceso crónico que toma grandes periodos de tiempo. Por tal motivo, se desarrolló también en nuestro laboratorio un modelo experimental en el cual la infusión del AMPA (7.5 mM) ocurre de manera lenta y continua durante varios días mediante el uso de minibombas osmóticas (Tovar-y-Romo, et. al., 2007). En este modelo, la muerte de las MNs y sus consecuencias ocurre de manera progresiva en un intervalo de tiempo mayor (cinco días). Brevemente, la pérdida de las MNs comienza en el segundo día después del implante de la bomba y las deficiencias motoras son claras a partir del tercer día. Ambos eventos alcanzan su máximo progreso en el quinto día después del implante. Otra diferencia entre este modelo y el de la microdiálisis es que en el modelo crónico, la parálisis inicia en el lado ipsilateral al sitio del implante y se extiende de manera progresiva hacia el lado contralateral, dejando completamente paralizadas ambas extremidades traseras (la microdiálisis únicamente paraliza la extremidad ipsilateral). Una gran ventaja de ambos modelos es que la muerte de las MNs ocurre sin necesidad

de un componente genético, definiendo así a estos modelos como modelos experimentales del tipo de ELA esporádica, la cual abarca al 90% de los casos de ELA. La principal limitación de nuestros modelos, es que se basan en la sobreactivación de los AMPARs, siendo que hasta la fecha, no se han obtenido evidencias convincentes de que esto ocurra en la enfermedad humana.

MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS Y NECROSIS

La muerte celular es un proceso fundamental en la homeostasis de los organismos, por lo que su estudio es de gran importancia. Los procesos de muerte han sido clasificados de acuerdo a su apariencia morfológica (que puede ser apoptosis, necrosis o autofagia), criterios enzimáticos (con o sin involucramiento de endonucleasas o de distintas clases de proteasas, como las caspasas, calpainas, catepsinas y transglutaminasas), aspectos funcionales (programada o accidental, fisiológica o patológica) o características inmunopatológicas (Melino, 2001; Kroemer, et al., 2009). La apoptosis y necrosis son temas de gran interés en esta tesis, por ello a continuación se describen brevemente ambos procesos.

El término apoptosis fue acuñado por Kerr en 1972 para describir un aspecto morfológico específico de la muerte celular. La apoptosis es caracterizada por el redondeo de la célula, la retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación nuclear (cariorexis), usualmente sin modificaciones ultraestructurales de organelos citoplásmicos, globulación de la membrana celular (manteniendo su integridad hasta las etapas finales del proceso) que conduce a la formación de vesículas (cuerpos apoptóticos) y la intervención de fagocitos residentes que fagocitan los cuerpos apoptóticos (*in vivo*). Es importante aclarar que no es correcto asumir que muerte celular programada (MCP) y apoptosis son sinónimos, porque la muerte celular que ocurre durante el desarrollo, puede manifestar características no apoptóticas (Baehrecke, 2002; Barkla y Gibson, 1999; Roach y Clarke, 2000).

La muerte celular apoptótica puede ser inducida por vías de señalización extrínsecas mediante receptores de muerte (como los receptores FAS), o intrínsecas a través de la mitocondria en respuesta a daño al ADN. La apoptosis ocurre en una secuencia bien organizada de cambios morfológicos (Kerr, et al., 1972). La célula primero sufre la condensación nuclear y del citoplasma con formación de pequeñas protuberancias en la membrana celular, que después se desprenden formando cuerpos apoptóticos, que son reconocidos y fagocitados rápidamente por células vecinas o macrófagos. Actualmente se conocen cuatro vías que conducen a la apoptosis

(Orrenius, et al., 2003): la vía Extrínseca, la Intrínseca, la dependiente de la caspasa 2, y la independiente de caspasas (Figura 4).

En la vía Extrínseca el reconocimiento de los ligandos forma el complejo de señalización de muerte inducible (DISC, por sus siglas en inglés), resultando en la activación de las procaspasas 8 o 10 (Boldin, et al., 1996; Muzio, et al., 1996), a partir de este momento, se pueden seguir dos caminos. En el tipo I, la caspasa-8 activa la procaspasa-3, que rompe las proteínas blanco, conduciendo a la apoptosis. En el tipo II, la caspasa-8 activa a Bid, el cual induce la translocación, oligomerización e inserción de Bax o Bak en la membrana externa mitocondrial. Este acontecimiento es seguido por la liberación de moléculas como el citocromo c, que en el citoplasma se asocia a APAF2 y a la procaspasa-9 para formar el apoptosoma. Después ocurre la activación de la caspasa-9, conduciendo a la activación de la procaspasa-3 (Li, et al., 1997). En la vía Intrínseca, las señales de muerte interactúan directa o indirectamente con la mitocondria, resultando en la formación del apoptosoma. Esta vía es controlada por la familia de proteínas Bcl-2 (regulan la liberación del citocromo c; Du, et al., 2000), proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs; por sus siglas en inglés; Srinivasula, et al., 2001), por el segundo activador mitocondrial de caspasas (Smac; Du, et al., 2000) y las proteínas Omi (regulación negativa de IAPs; Hegde, et al., 2002). La función del apoptosoma es regulada por la oncoproteína pro-timosina- α (Pro-T) y el supresor de tumores putativo asociado a la proteína HLA-DR (PHAP, por sus siglas en inglés; Jiang, et al., 2003). La vía intrínseca, también puede operar a través de un mecanismo independiente de las caspasas, el cual involucra la liberación desde la mitocondria y la translocación en el núcleo de al menos dos proteínas: el factor inductor de apoptosis (AIF; Susin, et al., 1996) y las endonucleasas G (EndoG; Li, et al., 2001). La activación de la procaspasa-2 por daño al DNA conduce a la liberación del citocromo c y a la formación del apoptosoma, esta vía es la dependiente de caspasa 2 (Robertson, et al., 2002; Lassus, et al., 2002). Recientemente se ha descrito una vía independiente de caspasas, mediada por la Granzima (GrA: proteasa de serina; Beresford, et al., 2001; Fan, et al., 2003). Después de haber ingresado al citoplasma de las células blanco de manera dependiente de calcio, a través de poros mediados por perforina, la GrA induce una vía caracterizada por la formación de ADN de cadena sencilla y la apariencia morfológica de la apoptosis. Las endonucleasas involucradas en la ruptura del ADN, son conocidas como GAAD (por sus siglas en inglés: GrA-activated DNase, también conocidas como NM23-H1), su actividad es inhibida por el complejo SET, que se encuentra localizado en el retículo endoplásmico. Este complejo está integrado por el inhibidor de la fosfatasa 2A (pp32) y las proteínas ensambladoras

del nucleosoma de SET, HMG2 y Ape1. En esta vía, GrA activa a SET, HMG2 y Ape1, pero no a pp32, para liberar a GAAD. GAAD activada transloca al núcleo y provoca la ruptura de la cadena de ADN (Beresford, et al., 2001; Fan, et al., 2003; Orrenius, 2003; figura 4).

La muerte celular necrótica o necrosis es caracterizada morfológicamente por un incremento en el volumen celular (oncosis), hinchamiento de organelos, ruptura de la membrana plasmática y la subsecuente pérdida del contenido intracelular. Durante mucho tiempo se ha considerado a la necrosis como un tipo de muerte celular accidental y descontrolada, pero recientemente se ha demostrado que la necrosis puede ser un proceso finamente controlado por vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos (Golstein y Kroemer, 2007; Festjens, et al., 2006). Por ejemplo, se ha visto que los receptores con dominio de muerte (TNFr1, Fas/CD95 y TRAIL-R, entre otros) y los receptores semejantes a-Toll (Toll-like, Tlr3 y Tlr4) inducen necrosis, usualmente en presencia de inhibidores de caspasas (Holler, et al., 2000; Kalai, et al., 2002). Algunos autores han propuesto el término “necroptosis” para indicar la necrosis regulada y diferenciarla de la necrosis accidental (Kroemer, et al., 2009).

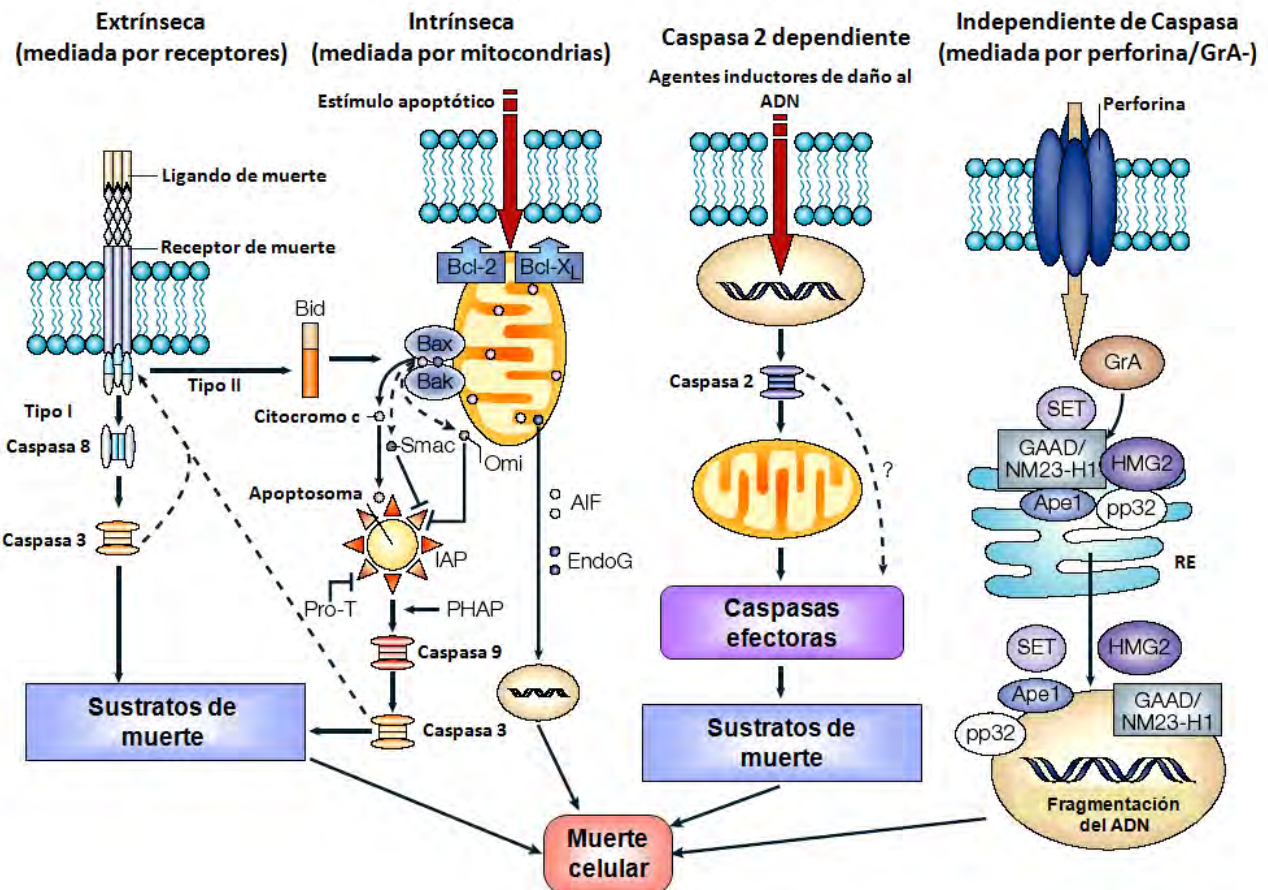


Figura 4: Vías de señalización que conducen a la apoptosis en células de mamífero. Modificada de Orrenius, 2003. Las abreviaturas aparecen en el texto.

Varios mediadores, organelos y procesos celulares han sido implicados en la muerte necrótica, pero hasta ahora, se desconoce cómo se interrelacionan entre sí. Los elementos causantes de la necrosis permanecen desconocidos. Algunos de estos fenómenos incluyen alteraciones mitocondriales (por ejemplo: el desacoplamiento de la cadena de electrones, la producción de especies reactivas de oxígeno-ROS, estrés nitrooxidativo por ácido nítrico y permeabilización de la membrana mitocondrial (Nicotera, et al., 1999), cambios lisosomales, alteraciones nucleares, degradación de lípidos, aumento en la concentración citosólica de calcio que dan lugar a una sobrecarga mitocondrial y a la activación de proteasa (no del tipo caspasas), por ejemplo calpainas y catepsinas (Golstein y Kroemer, 2007; Nicotera y Melino, 2004; Kroemer, et al., 2009). Sin embargo, hasta el momento no hay un consenso sobre los cambios bioquímicos que pueden utilizarse para la identificación inequívoca de la necrosis. A falta de un criterio bioquímico, la muerte necrótica es ampliamente identificada en términos negativos por la ausencia de marcadores apoptóticos (expresión de caspasas) ó marcadores de autofagia (autofagosomas). En particular cuando las células sufren una permeabilización temprana de su membrana plasmática se puede definir como un proceso necrótico (en la apoptosis esta permeabilización ocurre en etapas tardías).

IV.- Antecedentes.

La muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas se ha relacionado con tres factores que posiblemente interactúan entre sí: 1) la sobreactivación de receptores a aminoácidos excitadores (principalmente glutamato), 2) un incremento en la concentración intracelular de calcio y 3) la generación de especies reactivas de oxígeno o radicales libres. Estos tres factores se conjugan de tal manera que la alteración en alguno de ellos puede generar cambios en otro iniciando una reacción en cadena, dando como resultado daño y muerte neuronal por destrucción tanto de membranas plasmáticas como de organelos intracelulares (Coyle y Puttfarcken, 1993; Tapia, 1998; Tapia, et al., 1999).

Para fines prácticos, los antecedentes de esta tesis se han dividido en cuatro secciones: la primera aborda y explica el concepto de excitotoxicidad; la segunda está dedicada a los antecedentes de los dos modelos de degeneración espinal utilizados en el desarrollo experimental de esta tesis; en la tercera se mencionan algunas de las características ya conocidas sobre el proceso de muerte de las MNs en la ELA; y la cuarta parte se enfoca en describir brevemente los pocos trabajos dirigidos a determinar el papel e importancia de los circuitos inhibitorios en la médula espinal durante la ELA.

Parte I: Excitotoxicidad

Krebs y sus colaboradores demostraron en 1949 que el Glu estaba más concentrado en la materia gris cerebral que en la materia blanca (Krebs, et al., 1949). Años más tarde Hayashi realizó los primeros trabajos sobre las propiedades excitadoras del Glu (Hayashi, 1952, 1958). Casi al mismo tiempo, Lucas y Newhouse demostraron que el Glu podía ser neurotóxico, ya que su administración sistémica en ratones jóvenes causaba degeneración retinal (Lucas y Newhouse, 1957). Posteriormente, Curtis y su grupo de trabajo demostraron que la aplicación iontoforética del Glu y del aspartato en la medula espinal de gato, producía la despolarización de las MNs (Curtis, et al., 1959). Olney y Ho demostraron que la administración oral de Glu a roedores inmaduros y primates provocaba degeneración neuronal en áreas cerebrales carentes de barrera hematoencefálica (Olney y Ho, 1970). En conjunto, estos trabajos llevaron a formalizar el concepto de excitotoxicidad, es decir, la asociación de la sobreactivación de los receptores de Glu con el daño neuronal.

Actualmente se considera que el efecto excitotóxico inducido por el Glu es uno de los mecanismos celulares involucrados en las enfermedades neurodegenerativas como la ELA. La sobreactivación de los receptores de Glu genera un estado de hiperexcitabilidad, daño y muerte neuronal (Onley, et al., 1969; Onley, 1972; Lipton y Rosenberg, 1994, Tapia, 1998, Tapia, et al., 1999) manifestada en forma aguda por el hinchamiento celular ocasionado por el ingreso de diversos iones y agua al interior de la célula. Uno de los iones que entra en mayor concentración a la célula es el calcio. La entrada masiva de este catión sobrepasa la capacidad de amortiguamiento intracelular de la célula, provocando daño y muerte neuronal debido a la activación de enzimas como proteasas, lipasas, endonucleasas y fosfolipasas, lo que lleva a la desintegración de proteínas y fosfolípidos de membrana, así como a la generación de radicales libres y alteraciones del metabolismo energético mitocondrial (Coyle y Puttfarcken, 1993; Tapia, et al., 1999). Las alteraciones del metabolismo mitocondrial provocan la disminución en la producción de ATP, por lo cual decrece la actividad de la bomba de sodio-potasio (ATPasa Na-K), teniendo como resultado una disminución de la exclusión de Na⁺, alterándose el gradiente de concentración de este catión, despolarizándose la membrana neuronal y facilitando la respuesta de los receptores de tipo NMDA, debido a que son dependientes de voltaje (Choi, 1988; Olanow, 1993; Louvel, et al., 1997). Otra forma mediante la cual pueden presentarse estados de hiperexcitabilidad neuronal, es cuando los circuitos inhibidores (encargados del control de la actividad neuronal) sufren alteraciones.

Parte II: Modelos farmacológicos de degeneración espinal mediante la sobreactivación del receptor AMPA

Con el fin de conocer los mecanismos celulares involucrados en la muerte de las MNs espinales desarrollamos dos modelos farmacológicos experimentales de degeneración espinal (uno agudo y otro crónico). Ambos modelos utilizan como principio básico la excitotoxicidad mediada por Glu a través de receptores tipo AMPA permeables a calcio.

En ambos modelos de degeneración espinal *in vivo* se induce la muerte de las MNs espinales de manera farmacológica mediante la aplicación intramedular de AMPA, sirviendo de gran utilidad para el estudio de la ELA. Algunas ventajas de estos modelos son las siguientes: 1) Se observan los cambios celulares y conductuales conforme progresa la parálisis, lo cual facilita la correlación entre estos procesos; 2) la muerte de las MNs no está relacionada con ningún factor genético, por lo que se pueden utilizar como modelos para el estudio del tipo esporádico de la ELA; 3) la forma de aplicación del AMPA (por microdiálisis o minibombas osmóticas) facilita la aplicación y coaplicación de diversas sustancias, por ejemplo: sustratos energéticos, inhibidores de receptores o de enzimas, entre otros (Corona y Tapia, 2004; Tovar-y-Romo, et al., 2007).

El modelo agudo, basado en la aplicación de AMPA mediante la microdiálisis, ha permitido realizar grandes avances en el entendimiento de la ELA. Usando este modelo se demostró que el incremento de la concentración extracelular del Glu endógeno, provocado por la aplicación de 4-aminopiridina (bloqueador de canales de potasio) y PDC (bloqueador del transportador de Glu), así como por la estimulación de receptores NMDA y kainato en la médula espinal, no provoca la muerte de las MNs espinales. En contraposición, la estimulación de los receptores AMPA, induce de manera dosis dependiente la muerte de las MNs en el sitio de la microdiálisis y la parálisis de la correspondiente extremidad (Corona y Tapia, 2004). También se demostró que al bloquear el influjo de calcio usando NAS (1-naftil acetil espermina, bloqueador selectivo de los receptores AMPA permeables a calcio) o por la acción de un agente quelante de calcio, como el BAPTA-AM, se previene la muerte de las MNs espinales (Corona y Tapia, 2007). Actualmente este modelo está siendo usado para determinar la importancia de los sustratos energéticos como neuroprotectores en la muerte de las MNs inducida por la aplicación de AMPA (Santa Cruz, 2009).

Por otra parte el modelo crónico, en el que se emplean minibombas osmóticas para poder administrar el AMPA de manera crónica, tiene la gran ventaja de reproducir las características histopatológicas y conductuales de la ELA de manera progresiva. En este modelo, se demostró que la administración crónica de AMPA provoca de manera dosis dependiente la muerte de las MNs y su

consecuente parálisis. También se demostró que el mecanismo involucrado en la muerte de las MNs involucra la fosforilación de la proteína-cinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK); y que el efecto neuroprotector del VEGF (por sus siglas en inglés, Vascular Endothelial Growth Factor; que previene la pérdida de las MNs) se da mediante dos mecanismos: uno mediado por la activación de la PI3K (enzima fosfatidil-inositol-3 cinasa) a través del receptor del VEGF (VEGFR2: receptor tirosin-cinasa 2 para VEGF), y el segundo mediante una disminución en la fosforilación de la p38MAPK (Tovar-y-Romo, et al., 2007; Tovar-y-Romo y Tapia, 2010).

A pesar de estos avances, hasta la fecha no se ha identificado el mecanismo involucrado en la muerte de las MNs espinales en nuestros modelos ni en la enfermedad humana. Algunos grupos han tratado de definir el tipo de muerte de las MNs utilizando para este fin al ratón transgénico G93A como modelo experimental de ELA. A continuación describiremos brevemente estos trabajos.

Parte III: El ratón G93A en el estudio del proceso de muerte de las MNs en la ALS

El ratón transgénico G93A se caracteriza por expresar el gen de la SOD1 (metaloenzima encargada de catalizar la dismutación del anion superóxido a oxígeno molecular y agua; McCord y Fridovich, 1969) mutada asociada con la ELA humana de tipo familiar. El inicio y progreso de los síntomas y signos característicos de la ELA se presentan de manera dependiente del número de copias expresadas del alelo SOD1 mutado. Existen diferentes líneas del ratón G93A, algunas de ellas desarrollan la enfermedad de manera rápida quedando completamente paralizados y finalmente muertos en un periodo no mayor de 16 a 18 semanas. Otras líneas del G93A expresan una menor cantidad de copias del alelo SOD1 mutado y presentan un progreso de la enfermedad mucho más lento (Martin, et al., 2009). Usando este modelo para el estudio y caracterización de la muerte de las MNs, se ha demostrado que durante el progreso de la enfermedad existe la presencia de agentes apoptóticos como las caspasas activas. Específicamente la casp3a, ha sido observada mediante la técnica de Western Blot en muestras de tejido espinal de estos ratones. Asimismo, se ha corroborado su presencia en las MNs mediante el uso de microscopía de fluorescencia (Li, et al., 2000; Ohta, et al., 2008; Pasinelli, 2000). En ambos casos la actividad de la casp3 inicia desde etapas tempranas (70 días) permaneciendo durante el progreso de la enfermedad (Li, et al., 2000; Pasinelli, 2000). Por otro lado, el bloqueo farmacológico de la actividad de las caspasas (usando zVAD-fmk) y la sobreexpresión de agentes antiapoptóticos como el Bcl-X, retrasa el inicio de la enfermedad y prolonga la sobrevivencia de los organismos (Li, et al., 2000; Ohta, et al., 2008).

Otros grupos de trabajo han tratado de definir el proceso de muerte de las MNs mediante la microscopía electrónica de transmisión (MET). Se ha demostrado que durante el progreso de la ELA, las MNs sufren una vacuolización progresiva del citoplasma que es acompañada por un rearrreglo estructural de las membranas de algunos organelos celulares. En el caso de la mitocondria, las crestas mitocondriales (ubicadas en la membrana interna mitocondrial) se fragmentan formando pequeñas vacuolas en el interior de las mitocondrias, este evento se ha asociado con la falla energética involucrada en enfermedades neurodegenerativas como la ELA y con la liberación del citocromo c, un indicador temprano de apoptosis (Martin, et al., 1998, 2009; Bendotti, et al., 2001). Sin embargo, ninguno de estos trabajos ha reportado cambios morfológicos o ultraestructurales característicos de una muerte por apoptosis. Por ello la degeneración de las MNs en este ratón transgénico se propone que es mediante un proceso de muerte celular semejante a una necrosis prolongada involucrando un daño mitocondrial temprano, vacuolización y disolución celular (Martin y Lui, 2004; Martin, et al., 1998, 2009; Bendotti, et al., 2001). Hasta ahora ningún trabajo ha correlacionado los cambios ultraestructurales con la expresión de caspasas durante la muerte de las MNs. En esta tesis se utilizan de manera integral a la MET y la microscopía de fluorescencia para identificar en un modelo de degeneración espinal *in vivo*.

Otro aspecto que ha sido poco estudiado es el papel de los circuitos inhibitorios durante la ELA. La mayoría de los trabajos sobre ELA se ha enfocado en el papel del circuito excitador de Glu, dejando de lado la posible participación de los circuitos inhibidores de GABA y glicina en la muerte de las MNs.

Parte IV: Modificaciones de los circuitos inhibitorios y la importancia de estos cambios durante la ELA.

Los cambios en los circuitos inhibitorios tienen un papel preponderante en la fisiopatogénesis de diversos trastornos neuronales como la epilepsia, los síndromes de abstinencia y posiblemente en enfermedades neurodegenerativas como ELA (Chang y Martin, 2009; Clark et al., 1994; Doble y Martin, 1996; Smith et al., 1998). Estos trastornos tienen como característica principal el incremento de la excitabilidad que induce un estado de hiperexcitabilidad neuronal, que es consecuencia de alguno de los siguientes eventos que pueden surgir solos o asociados: a) disminución en la síntesis de los neurotransmisores inhibidores (GABA y Gly), b) disminución en la liberación del GABA o Gly, c) cambios en los sistemas de recaptura del GABA y Gly, d) modificaciones en la estructura (disminuyendo su funcionalidad) ó disminución en el número de sus receptores postsinápticos y

finalmente, f) disminución en la afinidad de los receptores postsinápticos hacia su ligando (Clark et al., 1994; Doble y Martin, 1996; Smith et al., 1998)

Existen pocos trabajos dirigidos al estudio del papel de los circuitos inhibitorios y el efecto de sus modificaciones durante la ELA. Usando al ratón transgénico G93A como modelo de estudio de la ELA, se ha encontrado que los circuitos inhibitorios en la ELA sufren una disminución progresiva en la cantidad de botones sinápticos glicinérgicos en el soma de las MNs (Chang y Martin, 2009). Además, se ha demostrado que durante la ELA existe un recambio en la expresión de las subunidades del receptor GABAA en la MNs, lo que provoca una disminución en la sensibilidad del receptor hacia su ligando (Carunchio et al., 2008; Lorenzo et al., 2006; Muller et al., 2008). Finalmente, Petri y cols. demostraron que en la corteza prefrontal y temporal de pacientes con ELA, existe una disminución significativa en la expresión del RNAm de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABAA, disminuyendo así la afinidad de los GABAARs hacia su ligando. Mientras que la enzima encargada de la síntesis del GABA, la glutamato descarboxilasa es sobreexpresada significativamente en estas regiones (Petri, et al., 2006).

Resumiendo los antecedentes mencionados en cuatro puntos podemos decir que: 1) Los trabajos realizados en el ratón G93A (modelo de ELA familiar) no terminan de explicar el tipo de muerte neuronal involucrado en pérdida de las MNs en la ELA; 2) los circuitos inhibitorios pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis y progreso de la ELA; 3) Los modelos diseñados en nuestro laboratorio son adecuados para el estudio de la ELA de tipo esporádico. Por tanto, 4) nuestros modelos de degeneración espinal pueden ayudar a identificar y caracterizar el proceso de muerte involucrado en la degeneración de las MNs durante la ELA. Así como la importancia de los circuitos inhibitorios en el control de actividad neuronal de la médula espinal, y su posible relación con la muerte de las MNs.

Planteamiento del problema

Actualmente el proceso de muerte las MNs en la ELA continúa sin conocerse. Algunos trabajos postulan un proceso de carácter apoptótico, en el cual se presenta la activación de la casp3 (microscopía confocal). Mientras que otros proponen un proceso no apoptótico con características necróticas (MET). Un aspecto que dificulta el progreso en el entendimiento del proceso de muerte de las MNs en la ELA, es que siempre se ha estudiado por separado desde dos vertientes, una morfológica (MET) y otra bioquímica (inmunocitoquímica), sin que se integren en una sola propuesta ambos conjuntos de información. Además, como se mencionó anteriormente, estos trabajos se han

realizado en modelos transgénicos de ELA, los cuales únicamente representan al 2% de los casos de ELA, es decir al tipo familiar de ELA relacionado con la mutación en la SOD1.

En nuestro laboratorio se han diseñado dos modelos de muerte de las MNs espinales por excitotoxicidad in vivo, teniendo como principal característica, la independencia de factores genéticos en el proceso de muerte de las MNs. Por ello, ambos modelos (agudo y crónico) son representativos de la gran mayoría de casos de ELA, la de tipo esporádica. Sin embargo, aún cuando en la actualidad en nuestro laboratorio se están diseñando estrategias farmacológicas que prevengan la muerte de las MNs, el tipo de muerte celular que ocurre en cada uno de estos modelos aún se desconoce.

Estamos convencidos que conocer el proceso de muerte de las MNs en nuestros modelos de degeneración espinal brinda la posibilidad de generar estrategias dirigidas a la prevención y atenuación de la muerte de las MNs durante la ELA. Por ello, la presente tesis tiene como objetivo principal caracterizar el proceso de muerte de las MNs en dos modelos de degeneración espinal (agudo y crónico), para acentuar las bases conceptuales que sirvan en el diseño de tratamientos para la ELA.

De acuerdo con los antecedentes presentados planteamos las siguientes hipótesis

V.- Hipótesis

Basados en la literatura revisada y en el tiempo de progresión de la parálisis producida por la perfusión de AMPA en nuestros modelos, proponemos dos hipótesis de trabajo. La primera hipótesis está enfocada en el proceso de muerte de las MNs, y la segunda en el papel de los circuitos inhibitorios de la médula espinal.

En lo referente al proceso de muerte de las MNs proponemos que:

- 1) La aplicación intramedular aguda de AMPA en ratas sanas inducirá la muerte rápida de las MNs mediante un proceso necrótico, mientras que la aplicación crónica de AMPA causará la muerte de las MNs mediante un proceso gradual y constante a través de un proceso de apoptosis.

Respecto al papel del GABA y la Gly en el control de la excitabilidad neuronal en la médula neuronal:

- 2) El control de la excitabilidad neuronal en la médula espinal está determinado por la actividad inhibitoria del GABA y Gly, por lo tanto el bloqueo de los circuitos inhibitorios de GABA y de Gly en la médula espinal, será suficiente para generar un estado de

hiperexcitabilidad capaz de inducir la muerte de las MNs y consecuentemente una parálisis.

VI.- Objetivos

Con el fin de comprobar nuestras hipótesis planteamos dos objetivos generales que guiaron el desarrollo de esta tesis:

OBJETIVOS GENERALES:

- 1) Caracterizar el proceso de muerte de las MNs espinales de la región lumbar de rata, después de la sobreactivación del receptor AMPA de manera aguda (por microdiálisis) y de manera crónica (a través del uso de minibombas osmóticas).
- 2) Determinar el efecto del bloqueo de la inhibición GABAérgica y glicinérgica en la médula espinal de rata.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Mediante el uso de la MET determinar los cambios ultraestructurales de las MNs lumbares en dos modelos in vivo de degeneración espinal en rata (agudo y crónico).

b) Determinar la presencia de la casp3a (involucrada en procesos de muerte celular apoptótica) en las MNs lumbares, mediante el uso de técnicas de inmunocitoquímica.

c) Evaluar los cambios de la actividad motriz asociados con la pérdida de las MNs lumbares con el uso de las pruebas de Rotarod, PGE y el registro de la zancada.

VII.- Enfoque experimental y metodología

En todos los experimentos utilizamos ratas macho con un peso aproximado de $285\pm 15g$ de la cepa Wistar. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo al reglamento para la investigación en materia de salud (México) y con la aprobación del comité local de cuidados animales. Los animales fueron mantenidos en un ambiente de laboratorio con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, con alimento y agua *ad libitum*.

Las ratas fueron entrenadas para realizar las pruebas conductuales del Rotarod, PGE y el registro de la zancada. Posteriormente fueron sometidas a una cirugía estereotáxica para realizar la microdiálisis o el implante de las minibombas osmóticas. Después de la cirugía se evaluó la conducta motora de las ratas diariamente, hasta el día de su perfusión. Finalmente, los animales fueron perfundidos para la obtención de la médula espinal, la cual se trató de acuerdo al protocolo a seguir (detallado más adelante).

Pruebas conductuales:

Para evaluar la actividad motriz de los organismos se utilizaron tres pruebas conductuales:

Rotarod: Este aparato consiste en un cilindro que gira a una velocidad inicial de 10 revoluciones por min con una aceleración constante de 0.2 rms. Se utilizó para determinar las alteraciones o deficiencias en la actividad motriz del caminar de las ratas. Las ratas se entrenaron para que se mantuvieran caminando sobre el cilindro durante un periodo de 2 min. Cada evaluación de las ratas se realizó por triplicado, registrándose el tiempo promedio de permanencia en el Rotarod

PGE: Esta prueba sirve para medir la fuerza del impulso de los cuartos traseros de las ratas. Consiste en una rejilla que es colocada primero en forma horizontal sobre la cual se coloca a la rata en uno de los extremos. Después, la rejilla con la rata se colocan en un plano vertical, quedando la rata con la cabeza hacia arriba y la cola hacia abajo. La rata es entrenada para que escale la rejilla. Si el impulso generado por los cuartos traseros es normal, la rata no tiene problemas para escalar la rejilla y tarda aproximadamente 2-4 seg. En cada evaluación se realizaron cuatro repeticiones registrando el tiempo que las ratas tardan en escalar la rejilla o bien el tiempo que tardan en caerse de la rejilla a causa de un impulso deficiente de los cuartos traseros.

Registro de huellas: Las ratas son entrenadas para caminar a lo largo de un corredor de 10 cm de ancho por 90 cm de largo. Cada vez que se realiza esta prueba, antes de colocar a la rata en el corredor se le pintan las patas traseras, la ipsilateral (lado del implante) de rojo y la contralateral de negro. Posteriormente se coloca a la rata en la entrada del corredor y se registran en papel las

huellas que va dejando al pasar. Finalmente, se cuantifica: 1) la distancia (cm) recorrida en 5 pasos, 2) los pasos requeridos para recorrer 30 cm y 3) se analiza la huella de la pisada.

Únicamente las ratas que realizaron de forma correcta las tres pruebas conductuales durante un periodo mínimo de una semana, fueron seleccionadas para la cirugía estereotáxica.

Cirugía estereotáxica:

Las ratas fueron anestesiadas mediante la inhalación de isoflurano al 5% en un recipiente cerrado. Posteriormente se colocaron en una unidad estereotáxica para columna vertebral (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). La anestesia fue disminuida a 3%, y mantenida al 2% durante la cirugía y la microdiálisis. Una vez montada en el estereotáxico se le rasuró la espalda a la rata y se le realizó una incisión longitudinal en la región lumbar de esta zona dejando al descubierto la columna vertebral y los músculos de la espalda. La columna vertebral fue montada en el estereotáxico con la ayuda de dos postes. Mediante estimulación mecánica se determinó la vértebra lumbar que controla los cuartos traseros, los músculos dorsales que rodean el proceso espinoso de esta vertebra se removieron y después, el proceso espinoso fue rebajado.

Microdiálisis: Una vez rebajado el proceso espinoso, en el lado derecho se taladró un orificio de 2-3 mm de diámetro suficientemente profundo para dejar al descubierto la médula espinal. Con ayuda de una aguja se rompieron las meninges que cubren la médula espinal, teniendo cuidado de no dañarla. Sobre la médula espinal descubierta, en el asta dorsal, se introdujo 1 mm la membrana de la cánula de microdiálisis (CMA/77/1 Cupr; Microdialysis Probe; poro de 6000 daltones, previamente lavada con agua por 2 h) quedando fija en esta posición con ayuda de una torre estereotáxica (Figura 5).

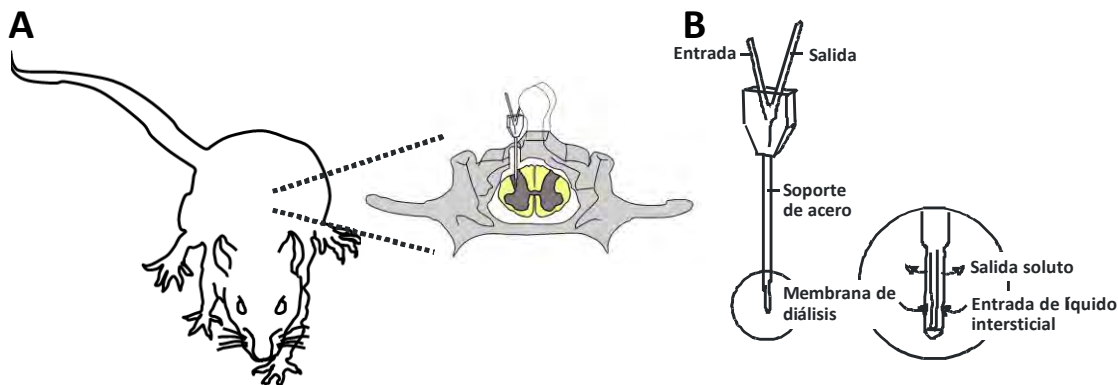


Figura 5: Esquemas del modelo agudo. En A se ilustra la región de la ratas que recibe la microdiálisis, mostrando a mayor aumento una ilustración en la que se aprecia la posición en la que se coloca la cánula de diálisis en la segunda vértebra lumbar. En B se muestran los componentes de una cánula de microdiálisis, haciendo un acercamiento del intercambio que se realiza en la membrana de diálisis.

Después de 60 min de estabilización perfundiendo únicamente solución Krebs, se inició el protocolo de las fracciones perfundidas (cada fracción de 25 μ l, a una velocidad de 2 μ l/min). En todos los grupos se realizó el siguiente protocolo: 3 fracciones basales perfundiendo únicamente solución Krebs, seguidas de dos fracciones de Krebs adicionado con el AMPA o la sustancia a perfundir (Bic o GABA), y finalmente tres fracciones de recuperación perfundiendo únicamente solución Krebs. Al finalizar la última fracción se removió la cánula de microdiálisis y las ratas fueron suturadas con hilo y colocadas por separado en cajas individuales (Corona y Tapia, 2004).

Minibombas osmóticas ALZET: en otras ratas, después de rebajar el proceso espinoso de la vértebra seleccionada, se realizó un trepano en el costado izquierdo de la base del proceso espinoso y se colocó en él un tornillo para sujetar el implante a la vértebra. Una vez asegurado el tornillo, se realizó en el lado derecho (ipsilateral) un orificio de 2-3 mm de diámetro, suficientemente profundo para llegar a la médula espinal. Con la aguja de una jeringa se rompieron las meninges que cubren la médula espinal, dejando al descubierto el asta dorsal, en la cual se introdujo 1 mm una cánula conectada a una manguera sin sellar (Figura 6). El implante fue cubierto y sellado con acrílico dental, teniendo cuidado de cubrir el tornillo y la base de la cánula, dejando libre el extremo sin sellar de la manguera conectada a la cánula.

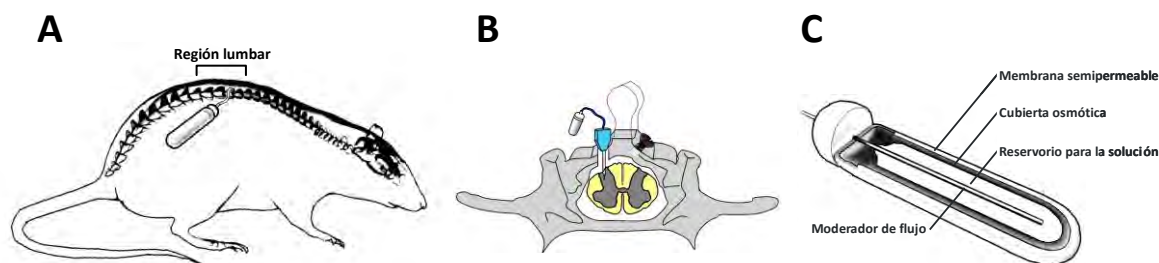


Figura 6: Esquemas del modelo crónico. En A se ilustra la región de la rata que es implantada y la ubicación subcutánea de la minibomba osmótica. B es un esquema de los componentes del implante: cánula, tornillo y minibomba osmótica. En C se muestran las partes que integran una minibomba osmótica.

Previamente a su implante las minibombas osmóticas (ALZET, modelo 2004; flujo de 0.25 μ l/h) fueron incubadas por 48 h a una temperatura constante de 37°C. El día del implante la minibomba osmótica se colocó subcutáneamente del lado derecho en la región de la espalda baja, la manguera sin sellar de la cánula del implante se conectó al catéter de la minibomba osmótica, esta unión fue sellada con pegamento epóxico. Al polimerizar este pegamento se suturó a la rata con grapas

quirúrgicas y se desmontó. Cada rata recibió 2 unidades de antibiótico (Benzetacil®, SANDOZ; intramuscular) y fueron colocadas cada una en una caja individual (Tovar-y-Romo, et al., 2007).

Después de la cirugía las ratas fueron evaluadas con las pruebas motrices durante los siguientes días, hasta el día de su perfusión. Las ratas cuyas médulas fueron utilizadas para el análisis por MET se perfundieron con paraformaldehído al 4% (PFA) adicionado con Gluteraldehído al 2.5% (GTA) disueltos en buffer de fosfatos (PB; 0.1 M). Las ratas cuyas médulas se usaron para los ensayos de inmunocitoquímica fueron perfundidas únicamente con PFA al 4% en PB 0.1 M.

Inmunocitoquímica:

Las medulas utilizadas para inmunocitoquímica se dejaron en postfijación en PFA durante 7 días, al quinto día de postfijación las meninges fueron removidas de las médulas. Posteriormente el tejido fue deshidratado a través de gradientes de sacarosa (10, 20 y 30% 72 horas c/u). Una vez deshidratada la médula espinal, se obtuvieron cortes transversales (40 μm de grosor) del sitio de perfusión en un criostato.

Para detectar por inmunofluorescencia a las MNs utilizamos un anticuerpo primario contra la colina acetiltransferasa (1: 200; cabra anti-ChAT, Millipore) hecho en cabra, éste anticuerpo fue identificado por un anticuerpo biotinilado anti-cabra (1:200; caballo anti-cabra, Vector), el cual se visualizó con el fluoróforo rojo de texas acoplado a Avidina (1:200; Texas red avidina, Vector). Para identificar la reacción glial, detectamos la expresión de la proteína ácida de la glía fibrilar (GFAP) usando un anticuerpo primario anti-GFAP (1:1000; ratón anti-GFAP, Sigma) hecho en ratón, el cual visualizamos con el fluoróforo FITC-anti ratón (1:200; cabra anti-ratón, Zymed). Finalmente, la casp3a fue reconocida con el anticuerpo primario anti-casp3a (1:100; conejo anti-casp3a, Ab-cam) hecho en conejo, el cual visualizamos con el fluoróforo Cy5 (Zymed) ó FITC anti-conejo (1: 200; cabra anti-conejo, Zymed).

Brevemente, el protocolo utilizado para, los ensayos de inmunocitoquímica fue: Los cortes transversales de la médula espinal se permeabilizaron en flotación por 5 min con Triton X-100 (0.3% disuelto en PB 0.1M). Después, se bloqueó con albumina de suero bovino (BSA al 5%) durante 1 h. Una vez bloqueado se incubaron con los anticuerpos primarios por 48 h a 4°C. Después de este periodo se realizaron 3 lavados con PB-Triton (c/u de 10 min). Se continuó con la aplicación de los anticuerpos secundarios por 2 h y al término de este periodo se realizaron tres lavados con PB-Triton. Finalmente los cortes fueron montados en laminillas silanizadas. La presencia de las proteínas marcadas fluorescentemente fue observada en un microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse

E600) y las fotografías se obtuvieron mediante el uso del microscopio confocal (Carl Zeiss FV1000). Para realizar el conteo de las MNs algunos cortes de la médula espinal fueron teñidos con violeta de cresilo y observados en el microscopio óptico, únicamente se tomaron en cuenta las MNs con núcleo visible.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Las ratas utilizadas para el estudio de la MET fueron perfundidas con 250 ml de PFA al 4 % adicionado con GTA al 2.5 % en PB 0.1 M. La médula espinal fue removida y colocada en postfijación en la misma solución por 24 h. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados con PBS (cada uno de 15 min) y después se colocaron por 2 h en una solución de tetróxido de osmio al 1 % en PBS. Al término de este tiempo se realizaron tres lavados con PBS (cada uno de 15 min) para después ser deshidratadas a través de gradientes de etanol (desde el 30% hasta 100% de etanol) a 4 °C y colocadas en una mezcla 1:1 de óxido de propileno-EPON por 48 h para su desecación. Después de desecarse, las médulas fueron incluidas en EPON puro (de acuerdo a la fórmula de Luft) y se dejaron polimerizar por 48 h a temperatura constante de 60 °C en una estufa. Una vez polimerizado el EPON, en un ultramicrotomo (Reichert-Jung) se obtuvieron cortes semifinos de 500 nm de grosor, los cuales se utilizaron para determinar el sitio correcto para la obtención de los cortes ultrafinos (80 nm de grosor). Los cortes ultrafinos fueron colocados individualmente en rejillas recubiertas de collodion con un solo hoyo. El día de la observación, los cortes ultrafinos fueron contrastados con la mezcla de Reynolds (acetato de uranilo 2% y citrato de plomo 2%) y observados en el microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200EXII. Las fotografías fueron tomadas a diferentes aumentos en películas fotográficas Kodak.

Análisis estadístico:

Las diferencias significativas entre el número de MNs del lado ipsilateral VS el lado contralateral en el mismo grupo se determinó mediante la prueba de t de student pareada, y para determinar las diferencias entre dos grupos diferentes se realizó la prueba de t de student no pareada. Las comparaciones entre más de dos tiempos ó grupos diferentes se realizaron a través del análisis de ANOVA seguidos por la prueba de post hoc de Bonferroni. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativamente diferente.

Resultados

Los resultados obtenidos en la presente tesis se han dividido en tres secciones con el fin de facilitar su presentación. La primer parte está enfocada en la caracterización de los modelos agudo y crónico de degeneración espinal. La segunda sección muestra las características del proceso de muerte de las MNs en ambos modelos, y en la última parte se presentan los resultados relacionados con el papel de los circuitos inhibitorios en la médula espinal.

Sección I. Dos modelos de degeneración espinal *in vivo* utilizados para el estudio de la ALS.

El primer paso en el desarrollo de la presente tesis fue reproducir los modelos agudo (Corona y Tapia, 2004) y crónico (Tovar-y-Romo et.al., 2007), sus características histopatológicas y conductuales representativas de la ELA.

Efecto de la aplicación aguda de AMPA a través de la microdiálisis

La aplicación de AMPA (6 mM) durante la microdiálisis generó la aparición de pequeñas contracciones en los dedos de la pata ipsilateral. Al despertar de la anestesia, las ratas presentaron pequeñas sacudidas y algunas contracciones en la pata ipsilateral (figura 7-A). El análisis de la prueba del Rotarod confirmó el déficit motriz provocado por la perfusión aguda del AMPA. Este déficit motriz significativo se presenta 3 h después de la aplicación del AMPA (N=9), es permanente y sólo ocurre en el lado ipsilateral. La aparición de este déficit motriz es correlacionado con la pérdida de las MNs del lado ipsilateral (únicamente en este lado), que también comienza 3 h después de la aplicación de AMPA y alcanza su máximo avance a las 24 h (figura 7-C y D, N=9). La disminución de las células marcadas con ChAT (usada para identificar a las MNs por su carácter colinérgico) corrobora la pérdida cuantificada de las MNs espinales en el asta ventral ipsilateral (Figura 8). Además el marcaje de la proteína GFAP (indicadora de procesos de astrogliosis) muestra que 24 h después de la aplicación del AMPA, se genera una astrogliosis en el asta ventral ipsilateral (Figura 8). El número de MNs (Figura 7-D) y la expresión de la GFAP en el lado contralateral no presentaron alteraciones (Figura 8). Por su parte la perfusión de solución Krebs (grupo control, N=6) no provocó la muerte de las MNs, ni el déficit motriz (Figura 7-Cy D), ni tampoco la astrogliosis (Figura 8) en el lado ipsilateral.

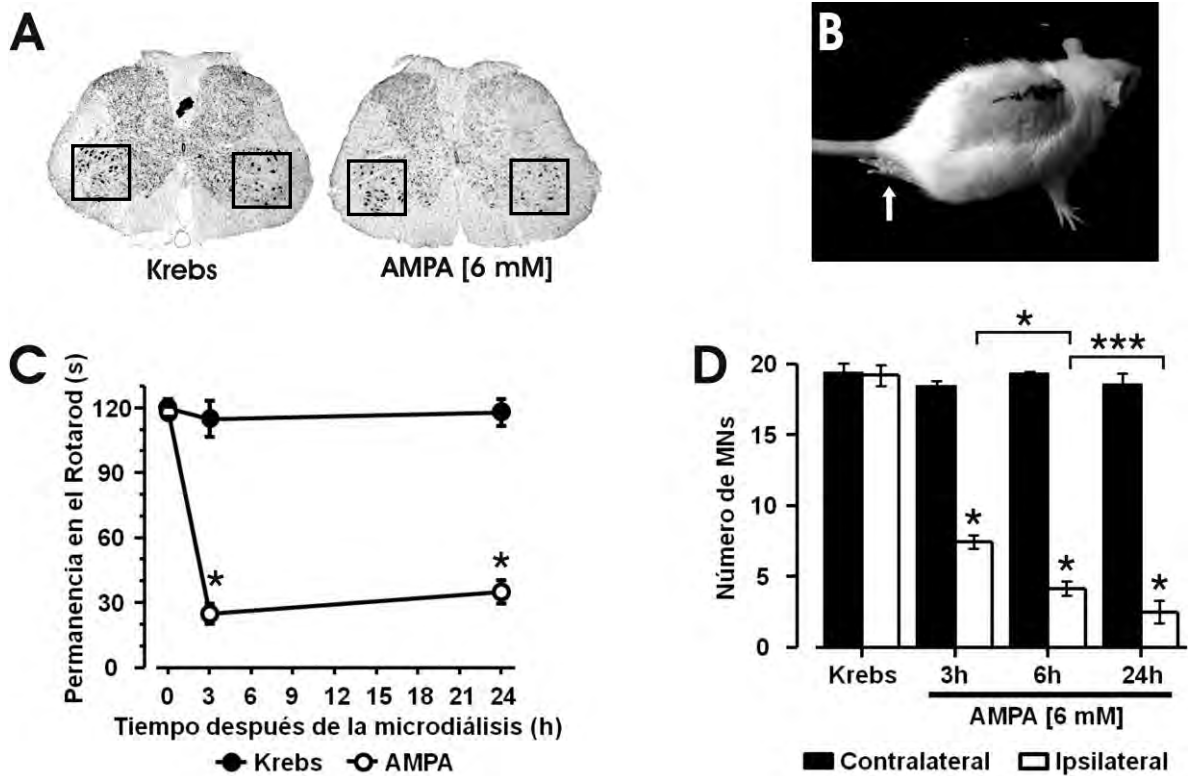


Figura 7. La perfusión intramedular aguda de AMPA 6 mM a través de la microdiálisis provocó la parálisis permanente del lado ipsilateral, caracterizada por la inmovilidad del cuarto trasero (flecha en B). Esta parálisis provocó deficiencias en la realización de la prueba del Rotarod a partir de 3 h después de la perfusión del AMPA (C). El déficit motriz es correlacionado con la pérdida de las MNs cuantificadas (D) en cortes transversales de la médula espinal del sitio de perfusión teñidos con violeta de cresilo (A; el área en donde se ubican las MNs se encuentra marcada con cuadros). Krebs, N=6; AMPA 3 h, N=9; 6 h, N=7; 24 h, N=9 *** P < 0.0001; * P < 0.01.

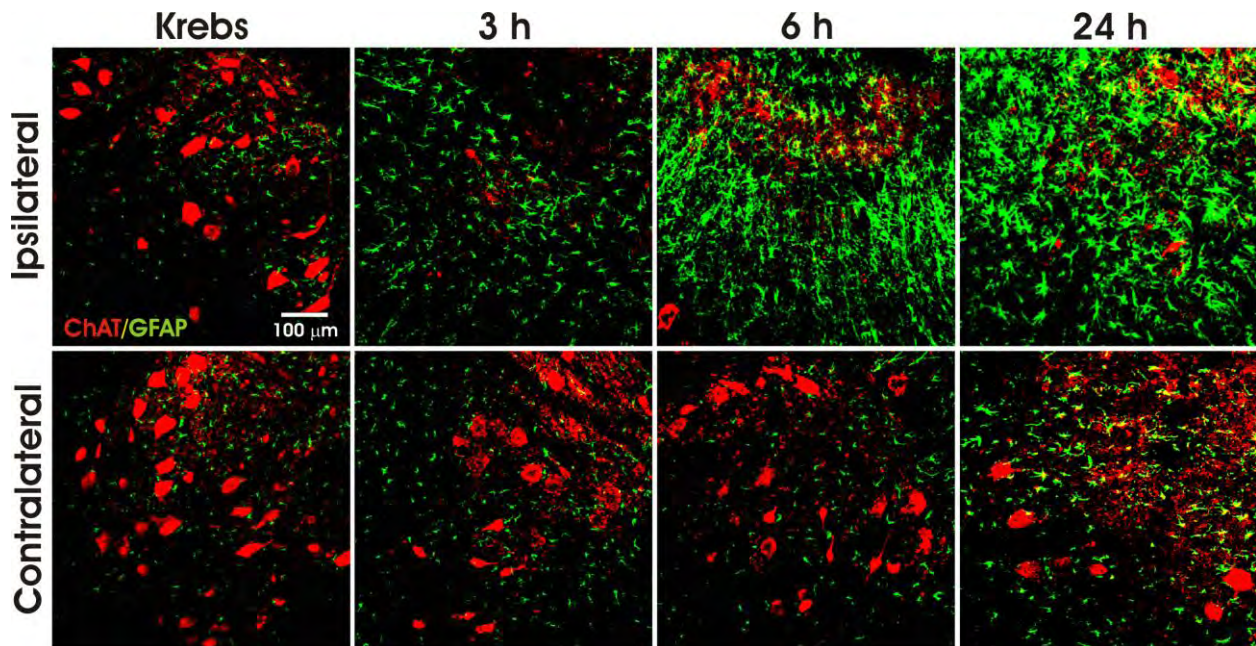


Figura 8. Micrografías representativas de las astas ventrales inmunomarcadas para colina acetiltransferasa (ChAT; rojo) y para la proteína ácida de la glía fibrilar (GFAP; verde) en la sección lumbar de la médula espinal de ratas tratadas agudamente con AMPA. Note la pérdida de MNs y la reacción glial inducida por la perfusión de AMPA en el lado ipsilateral.

La perfusión aguda de AMPA reproduce dos de las principales características histopatológicas de la ELA humana: 1) provoca la muerte rápida de las MNs del lado ipsilateral, correlacionada con 2) el déficit motriz observado.

Efecto de la aplicación crónica de AMPA a través de minibombas osmóticas ALZET

Las ratas que fueron implantadas con minibombas osmóticas desarrollaron una parálisis progresiva y bilateral de los cuartos traseros a lo largo de 5 días. Mediante el análisis biomecánico del registro de la zancada y el análisis de la evaluación de la actividad motriz mediante el Rotarod y el PGE cuantificamos con detalle la progresión de la parálisis (Figura 9).

Los síntomas iniciales de la parálisis iniciaron a las 24 h después del implante de la minibomba osmótica, caracterizados por el retardo en la extensión de los dedos de la pata ipsilateral. Para determinar esto la rata es levantada por la cola, en condiciones normales extiende inmediatamente los dedos de ambas patas, mientras que en el caso de las ratas tratadas con AMPA tardan en extender los dedos de la pata ipsilateral. Mediante el análisis biomecánico de la zancada se demostró que 24 h después del implante, el tratamiento con AMPA provocó un incremento significativo en el número de pasos necesarios para recorrer 60 cm y de manera inversa, disminuyó la distancia recorrida en 5 pasos. La perfusión de únicamente de medio krebs no provocó alteraciones en los parámetros cuantificados del patrón de zancada (Figura 9 A y C). Sin embargo, las pruebas del Rotarod y del PGE no muestran alteraciones motrices significativas en este tiempo.

Al segundo día del implante, las ratas tratadas con AMPA continúan realizando prácticamente normal las pruebas del Rotarod y del PGE (no existen diferencias significativas con el primer día). La distancia recorrida en 5 pasos continúa decreciendo mostrando una tendencia a disminuir. Así mismo, la cantidad necesaria de pasos para recorrer 60 cm continúa incrementándose (Figura 9-C). La pata contralateral comienza a mostrar los primeros síntomas de la parálisis.

En el tercer día del implante inicia la parálisis. La pata ipsilateral se encuentra totalmente paralizada, mientras que y la contralateral muestra un gran déficit motriz (los dedos de esta pata ya no se extienden al caminar, figura 9A-día3). En este día las pruebas del PGE y del Rotarod comienzan a tener diferencias significativas. En el grupo tratado con AMPA se cuantificó el mayor tiempo para escalar la rejilla del PGE (Figura 9-E), acompañado de un declive significativo en el tiempo de permanencia en el Rotarod (Figura 9-D). La cantidad de pasos necesarios para recorrer 60 cm y la distancia recorrida en 5 pasos continúan con sus tendencias a incrementar y disminuir, respectivamente (Figura 9-C).

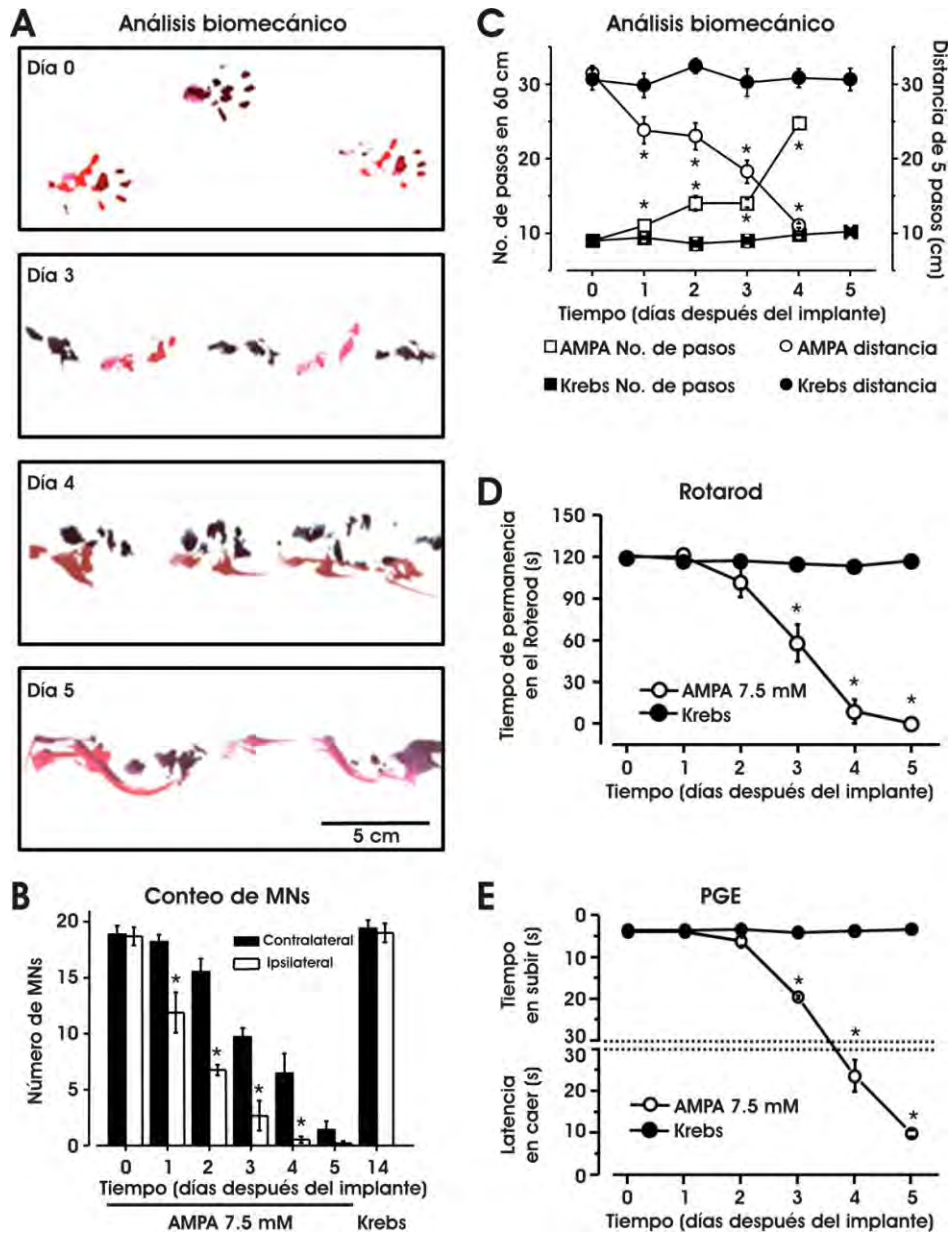


Figura 9. Características del déficit motriz provocado por la aplicación crónica de AMPA 7.5 mM. A) Registros representativos del patrón de huellas en los días 0, 3, 4 y 5 durante la perfusión crónica de AMPA a través de minibombas osmóticas, el día 0 es igual al patrón de huellas control (perfusión de medio Krebs). B) Conteo de las MNs durante el proceso de la parálisis (AMPA N=7; Krebs N=6). C) Curso temporal del análisis biomecánico del registro de huellas. La aplicación de AMPA provoca un incremento en la cantidad de pasos necesarios para recorrer 60 cm desde el segundo día (■), e inversamente, disminuye de forma gradual la distancia recorrida en 5 pasos (●). D) Curso temporal de la prueba del Rotarod. Cada punto representa la media \pm el error estándar de 8 ratas tratadas con AMPA 7.5 mM (○) y 6 ratas tratadas solución Krebs (●). E) Curso temporal de la prueba de PGE de ratas control (Krebs; N=6) y con AMPA 7.5 mM (N=8). $P < 0.0001$ en el cuarto día del implante, la pata ipsilateral está totalmente paralizada, mientras que la contralateral comienza a arrastrarse. Consecuentemente, las ratas son incapaces de permanecer en

el Rotarod y en el PGE (Figura 9 D y E). En el quinto día, las ratas están paralizadas bilateralmente (Figura 9). En análisis biomecánico de la zancada no se realizó para este día, debido a que era imposible distinguir los pasos en el registro de las huellas.

Estos cambios en la actividad motriz correlacionan con el análisis histológico realizado. La perfusión crónica de AMPA causó la pérdida progresiva de las MNs teñidas con violeta de cresilo en el sitio del implante (Figura 9-B). La pérdida de MNs identificada también por el decremento en las células marcadas positivamente para ChAT (Figura 10 color rojo) inicia en el lado ipsilateral y se extiende paulatinamente hacia el lado contralateral. La pérdida de MNs se acompaña de una astrogliosis progresiva, marcada por inmunofluorescencia mediante la detección de la GFAP (Figura 10 color verde).

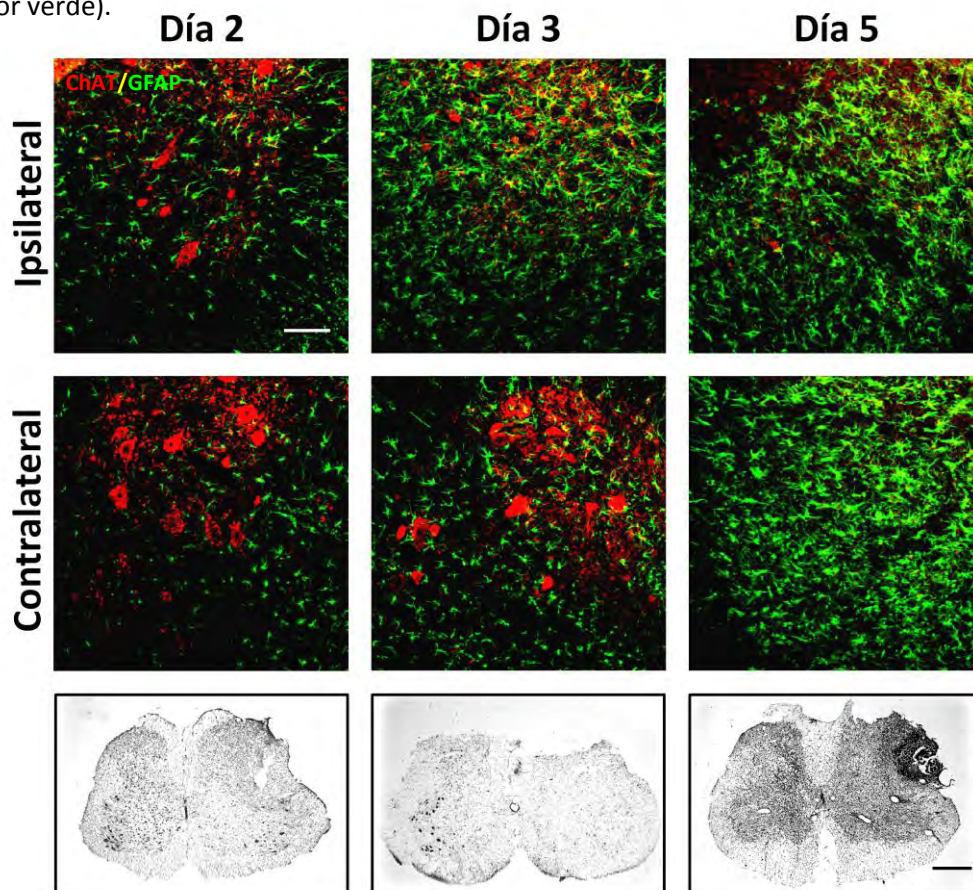


Figura 10. Efecto de la aplicación crónica del AMPA (7.5 mM) sobre las MNs de la médula espinal. Micrografías representativas de las astas ventrales inmunomarcadas para colina acetiltransferasa (ChAT; rojo) y la proteína ácida de la glía fibrilar (GFAP; verde) en la sección lumbar de la médula espinal de ratas tratadas crónicamente con AMPA. Note la pérdida considerable de MNs y la reacción glial en ambas astas ventrales. Barra de escala = 100 μ m. En los paneles inferiores se muestran cortes transversales de la médula espinal teñidos con violeta de cresilo, los puntos negros de mayor tamaño en las astas ventrales son las MNs. Escala de 0.5 mm. N= 11 ratas por día.

Estos resultados demuestran que la aplicación crónica de AMPA reproduce las principales características de la ELA de tipo esporádico: 1) provoca la pérdida progresiva de las MNs espinales y 2) su consecuente parálisis en los cuartos traseros, acompañada por una astrogliosis, sin la intervención de algún factor genético.

Sección II. Caracterización del proceso de muerte de las MNs espinales en dos modelos de degeneración usados para el estudio de la ELA.

Mediante el uso de la microscopía electrónica de transmisión (MET) identificamos las alteraciones morfológicas y ultraestructurales de las MNs durante su proceso de muerte inducido por excitotoxicidad mediada por receptores tipo AMPA. En el modelo agudo, únicamente las MNs del lado ipsilateral presentaron alteraciones, las MNs del lado contralateral (Figura 11-A) siempre mantuvieron una morfología celular y de sus organelos normal, semejante a la observada en ratas tratadas solo con medio Krebs (Figura 11-B, grupo control).

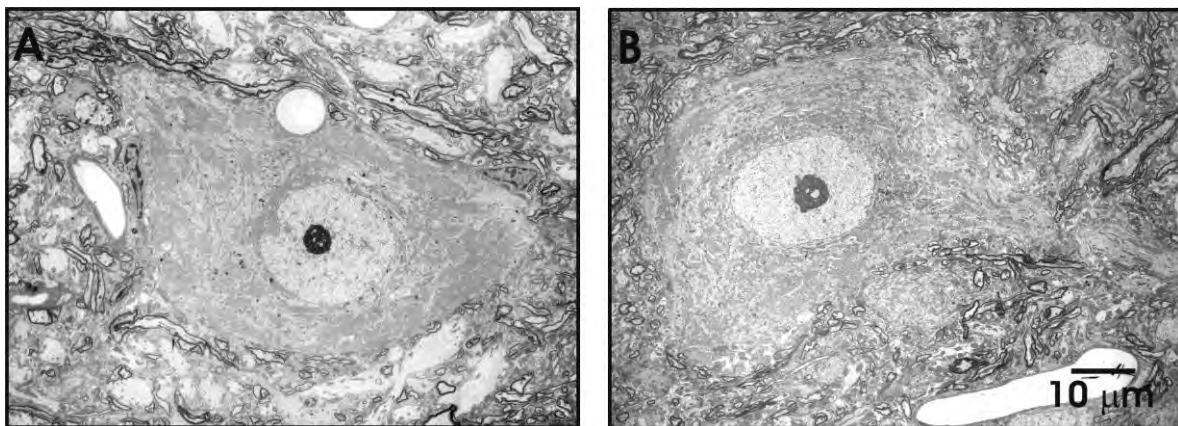


Figura 11. Micrografías electrónicas de MNs controles. En A se muestra una MN del asta ventral contralateral de una rata tratada de forma aguda con AMPA 6 mM (N=15 ratas). En B se muestra una MN del asta ventral ipsilateral de una rata tratada únicamente con medio Krebs (N=4 ratas). Note que no existen diferencias morfológicas entre la MNS de A y B.

En el modelo agudo la pérdida de MNs inducida por la microdiálisis de AMPA, ocurre únicamente en el lado ipsilateral e inicia 3 h después de la aplicación del AMPA (Figura 7-D). Sin embargo, en etapas tempranas (1.5 h después de la microdiálisis del AMPA, N=5 ratas), aun sin muerte celular, encontramos pequeños espacios vacíos en el citoplasma de algunas MNs (Figura 12-A) y un deterioro mitocondrial caracterizado por el hinchamiento y ruptura de mitocondrias (Figura 13). Algunas mitocondrias muestran la vesiculación de su membrana interna mitocondrial (MIM; Figura 13). Después de 3 h de la perfusión del AMPA algunas MNs presentan discontinuidades en su membrana celular (Figura 12-B; N=6) y envoltura nuclear. Los espacios vacíos en el citoplasma son de

mayor tamaño y las mitocondrias se encuentran hinchadas y reventadas (Figura 13). En este tiempo no se observaron cambios en otros tipos celulares. Estas alteraciones morfológicas rápidas indican que las MNs que se pierden en las primeras 3 h después de la perfusión del AMPA, mueren mediante un proceso de muerte celular de tipo necrótico.

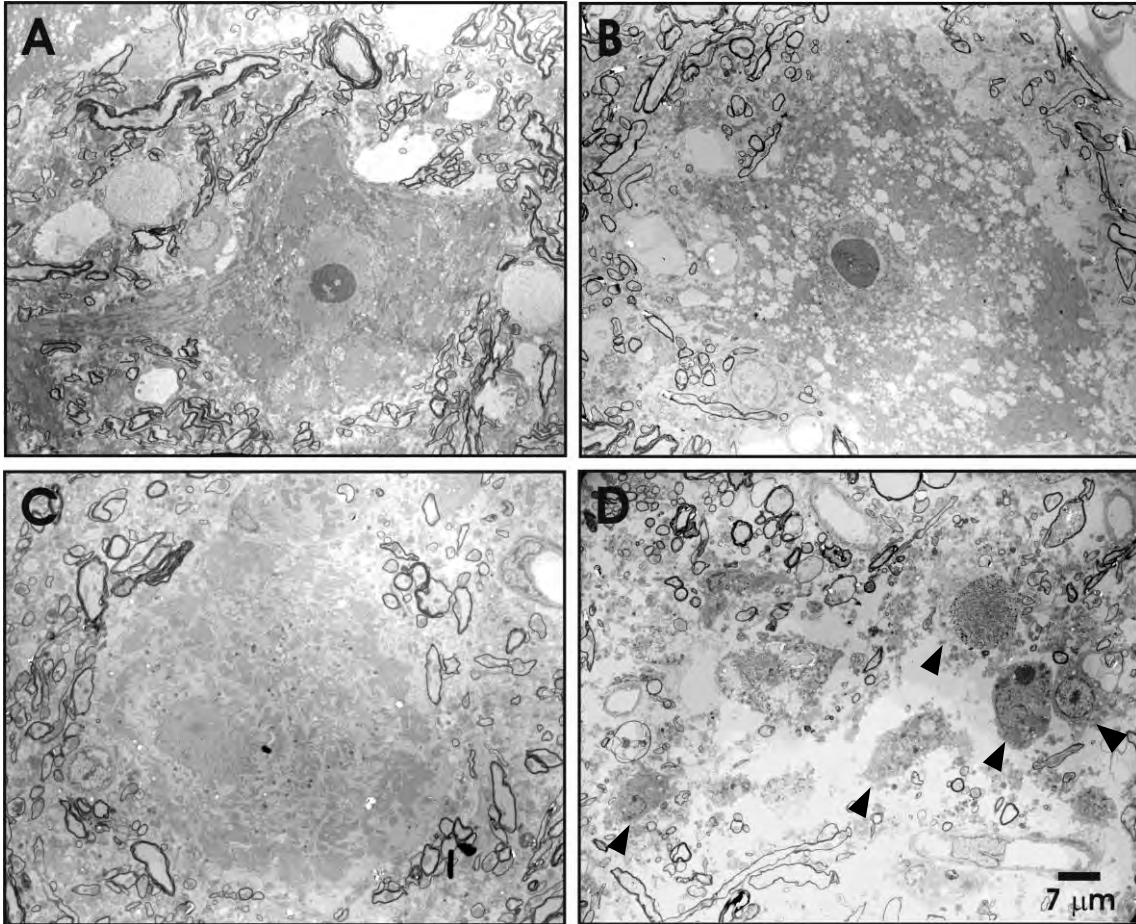


Figura 12. Cambios morfológicos de las MNs producidos por la perfusión aguda de AMPA 6 mM. Los incisos A-C corresponden a micrografías electrónicas de bajo aumento de MNs del lado ipsilateral en diferentes tiempos después de la microdiálisis (A-1.5 h, N=5 ratas; B-3 h, N=6 ratas; C-24 h, N=6). El proceso deletéreo de las MNs comienza desde 1.5 h después del AMPA (A), aunque en este tiempo no se presente muerte celular. Las MNs presentan alteraciones en sus organelos, no visibles a este aumento, ver figura 13. Tres horas después del AMPA (B), cuando inicia la pérdida de MNs y la parálisis, las MNs presentan discontinuidades en la membrana celular y una gran cantidad de espacio vacíos en su citoplasma. Únicamente 24 h (D) después de la microdiálisis se encontraron células de menor tamaño (triángulos) cercanas a los restos de las MNs. Las MNs sobrevivientes (C) presentan alteraciones en sus componentes celulares (ver figura 13).

Después de 24 h de la microdiálisis de AMPA (N=6) observamos la aparición de células de menor tamaño con morfología semejante a la de macrófagos. Estas células fueron encontradas únicamente en el lado ipsilateral en zonas cercanas a los restos de las MNs (figura 12-D). Las MNs

que aún sobrevivían (aproximadamente el 10 %; Figura 12-D) presentaban una morfología ligeramente alterada, sin embargo, en su interior sus componentes se encontraban hinchados o reventados (Figura 13). La aparición de las células de menor tamaño probablemente se deba a que la muerte de las primeras MNs puede inducir la activación de otros tipos celulares como la microglía, la cual al ser activada puede desempeñar funciones de macrófagos. Las MNs encontradas a las 24 h en el lado ipsilateral, presentan alteraciones con características diferentes que las primeras MNs perdidas, sugiriendo un proceso de muerte diferente.

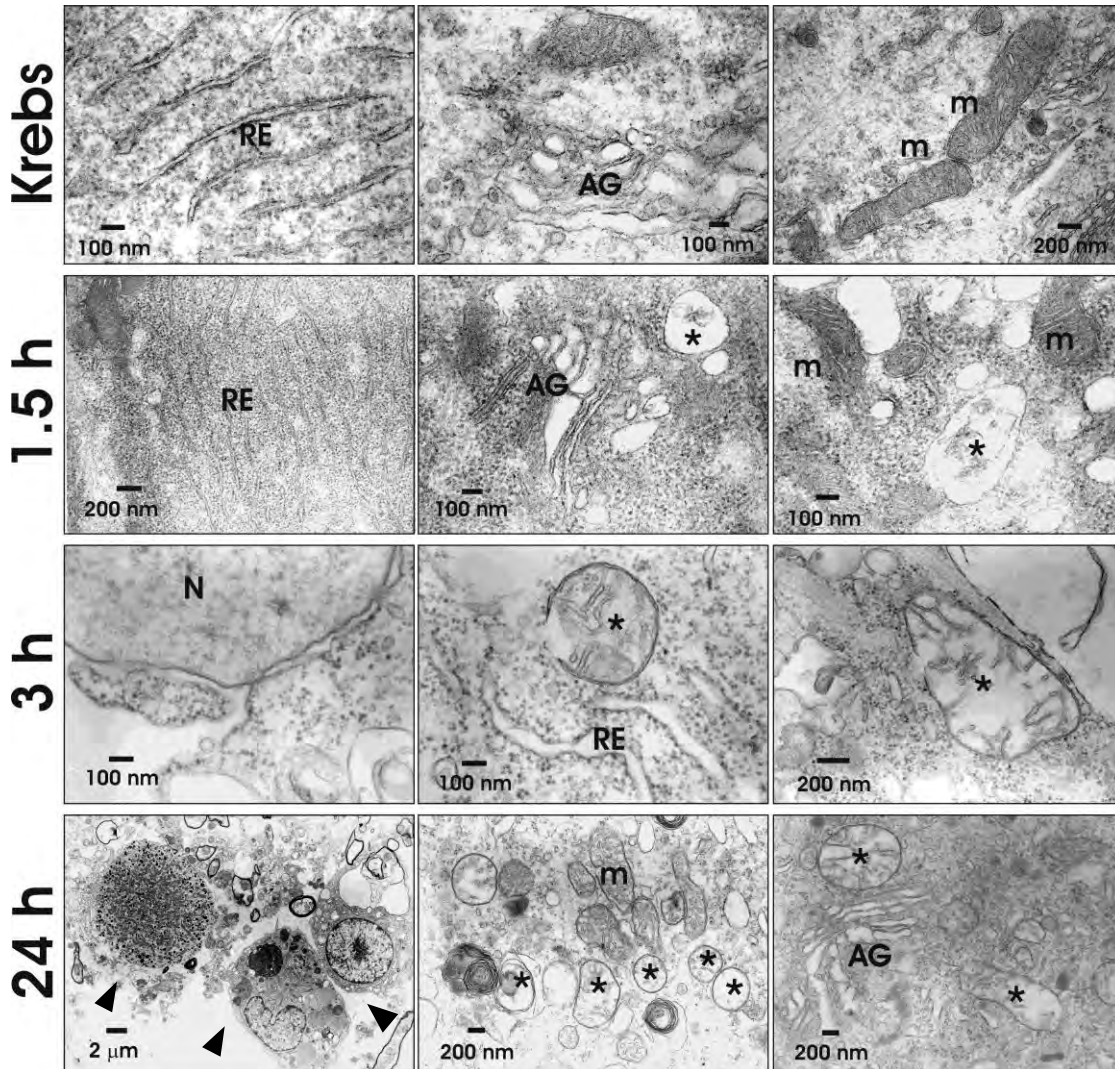


Figura 13. Alteraciones ultraestructurales en los organelos de MNs espinales del modelo agudo. En la fila superior se muestran microfografías electrónicas del lado ipsilateral tratado con medio Krebs. El proceso deletéreo inducido por la perfusión del AMPA en las MNs del lado ipsilateral comienza a 1.5 h (segunda fila) con un hincamiento mitocondrial y el rearrreglo de la membrana interna mitocondrial (MIM). Después de 3 h (tercer fila), las MNs presentan grandes espacios vacíos en su citoplasma, ruptura e hinchamiento mitocondrial y la vesiculación de la MIM en algunas mitocondrias (derecha). Después de 24 h (última fila) se presentan células pequeñas de tipo macrófago (izquierda, triángulos) en los restos de MNs. Las mitocondrias de las MNs sobrevivientes a las 24 h se encuentran hinchadas o con la MIM vesiculada. AG: aparato de Golgi, m: mitocondria normal, *: mitocondria dañada, N: núcleo de la MN, RE: retículo endoplásmico.

Para determinar si la caspasa-3 se activa durante este proceso de muerte celular de las MNs en este modelo, realizamos ensayos de inmunocitoquímica a 1.5 (N=7), 3 (N=8) y 24 h (N=7) después de la perfusión aguda por microdiálisis del AMPA (Figura 14).

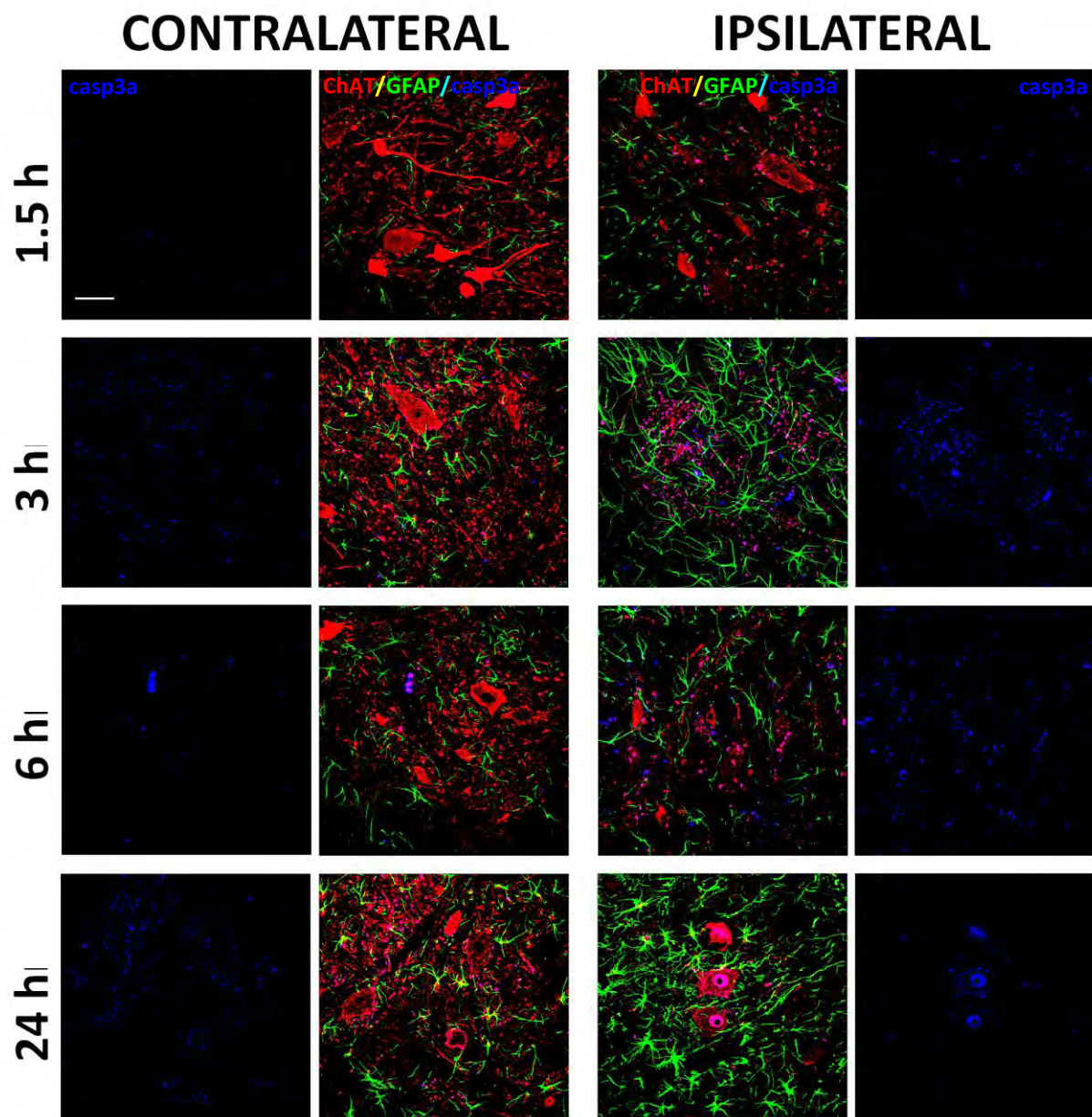


Figura 14. La muerte de las MNs inducida por la perfusión aguda de AMPA no involucra la aparición de la casp3a. Micrografías representativas de inmunocitoquímicas para ChAT (rojo), GFAP (verde) y casp3a (azul) en secciones lumbares de médula espinal a 1.5 (N=7), 3 (N=8), 6 (N=5) y 24 (N=7) h después de la microdiálisis de AMPA. Durante las primeras seis horas después del AMPA, ninguna MNs del lado ipsilateral presentó la marca positiva para la casp3a (rosa). Sin embargo, 24 h después del AMPA algunas MNs del lado ipsilateral expresaron la casp3a. La muerte de las MNs y la astrogliosis que la acompaña, únicamente se presenta en el lado ipsilateral. La barra de escala corresponde a 50 μ m.

El análisis inmunocitoquímico demostró que el proceso de muerte de las primeras MNs pérdidas a 1.5, 3 y 6 h después del AMPA, ocurre de manera independiente de la activación de la caspasa-3. Sin embargo, 24 h después de la perfusión del AMPA, algunas MNs sobrevivientes del lado ipsilateral expresan la casp3a (Figura 14). Otra característica importante de este modelo es que la muerte de las MNs es acompañada de una astrogliosis, esto es de importancia, puesto que se ha demostrado que la astrogliosis puede favorecer la activación de la vía extrínseca de la apoptosis. Estos resultados nos muestran que la muerte de las MNs en este modelo ocurre probablemente a través de dos procesos de muerte celular que ocurren en forma consecutiva. El primero con características necróticas y el segundo con características apoptóticas.

Por otra parte, como ya mencionamos, mediante el uso de las minibombas osmóticas la progresión de la parálisis y la administración del AMPA ocurren de manera crónica en un intervalo de tiempo mayor (cinco días). En estas condiciones observamos con MET muestras del día 1 (N=4), 2 (N=5), 3 (N=5), 4 (N=4) y 5 (N=6) después del implante de la minibomba osmótica cargada con AMPA 7.5 mM.

En este modelo crónico de ELA, las MNs mueren paulatinamente a través de un proceso degenerativo. Con base en las alteraciones morfológicas de las MNs, distinguimos cuatro etapas durante su proceso degenerativo (Figura 15). En la primera etapa (Figura 15-A) encontramos que las MNs no presentan alteraciones en su morfología, aunque la observación de sus componentes celulares revela que en este momento comienza un hinchamiento del RE (Figura 16-B). En la segunda etapa (Figura 15-B), las MNs comienzan presentar alteraciones morfológicas: incrementan su tamaño, debido a que en su interior el RE continúa hinchándose y además aparecen vacuolas vacías en su citoplasma (Figura 15-B). Algunas mitocondrias presentan una vesiculación de su membrana interna, sin embargo, la gran mayoría preserva una morfología normal (flechas en la figura 16-C). En la tercera etapa (Figura 15-C) la morfología de las MNs se encuentra muy deteriorada, debido a la presencia de vacuolas de gran tamaño en su interior. Además, en la periferia del citoplasma de las MNs se presentan grandes áreas prácticamente vacías, que denominamos pozas (P), que pensamos, son el resultado de la fusión de varias vesículas. A diferencia de las vesículas, las P contienen en su interior pequeñas porciones de citoplasma de diversos tamaños (triángulos en la figura 16-D). Una característica importante de esta etapa es que la membrana celular preserva su continuidad y aún existen mitocondrias que mantienen íntegra su membrana interna (Figura 16-D). Finalmente, en la cuarta etapa se presenta la disolución de la membrana celular y con ello la muerte de la MN (Figura 15-D).

El deterioro y muerte de las MNs se acompañan por el incremento en la cantidad de células de menor tamaño (aproximadamente 10 μm). Estas células poseen características morfológicas semejantes a los macrófagos, como: presencia de filipodios, núcleo arriñonado ó multinucleadas y una gran cantidad de cuerpos densos en su interior (triángulos en la figura 15-D). Probablemente, estas células de menor tamaño estén encargadas de fagocitar y degradar los restos celulares de las MNs.

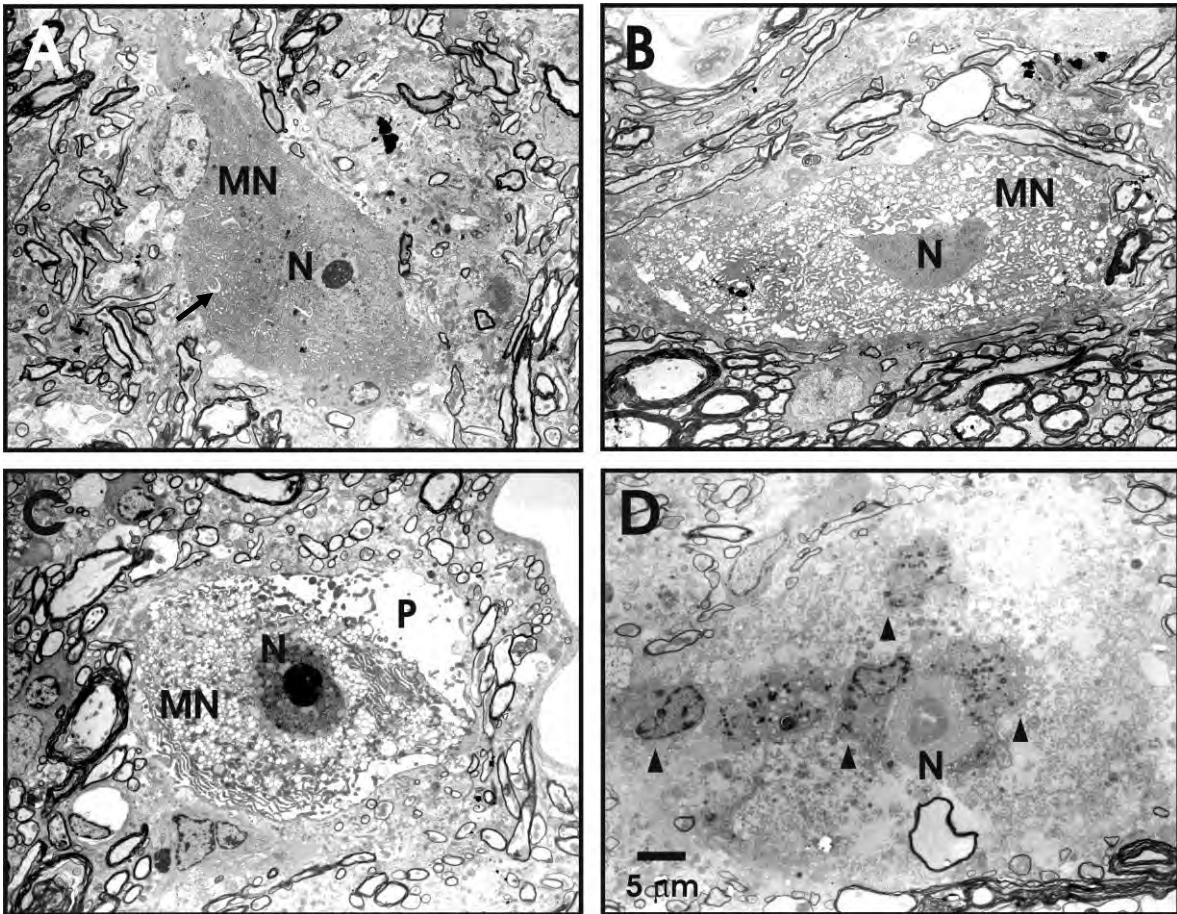


Figura 15. Micrografías electrónicas representativas de las etapas degenerativas de las MNs espinales durante su muerte inducida por la sobreactivación crónica del receptor AMPA. A) Primera etapa: las MNs conservan una morfología aparentemente normal. Sin embargo, su RE comienza a hincharse (flecha). B) Segunda etapa: existe una gran cantidad de vacuolas en el citoplasma de las MNs las cuales son de mayor tamaño mientras más alejadas se encuentran del núcleo. C) Tercera etapa degenerativa: las MNs se encuentran hinchadas, pero preservan su membrana celular íntegra. Las vacuolas citoplásmicas son más abundantes y de mayor tamaño. En el borde de las MNs se forman las pozas (P), posiblemente originadas de la fusión de varias vacuolas (a diferencia de las vacuolas, las P contienen en su interior restos de citoplasma). D) Cuarta etapa: ocurre la disolución celular. A partir de este momento se incrementa la cantidad de células de menor tamaño en los restos de las MNs. En esta micrografía se aprecian los restos del citoplasma y el núcleo (N) de una MN, el cual está rodeado por células de menor tamaño (triángulos).

Es importante aclarar que las etapas degenerativas de las MNs no se presentan al mismo tiempo en todas la MNs de la misma asta, y mucho menos en ambos lados (ipsilateral y contralateral) de la médula espinal. Sin embargo, es claro que durante el progreso de la parálisis cada día tiene una etapa degenerativa característica en cada asta ventral de la médula espinal.

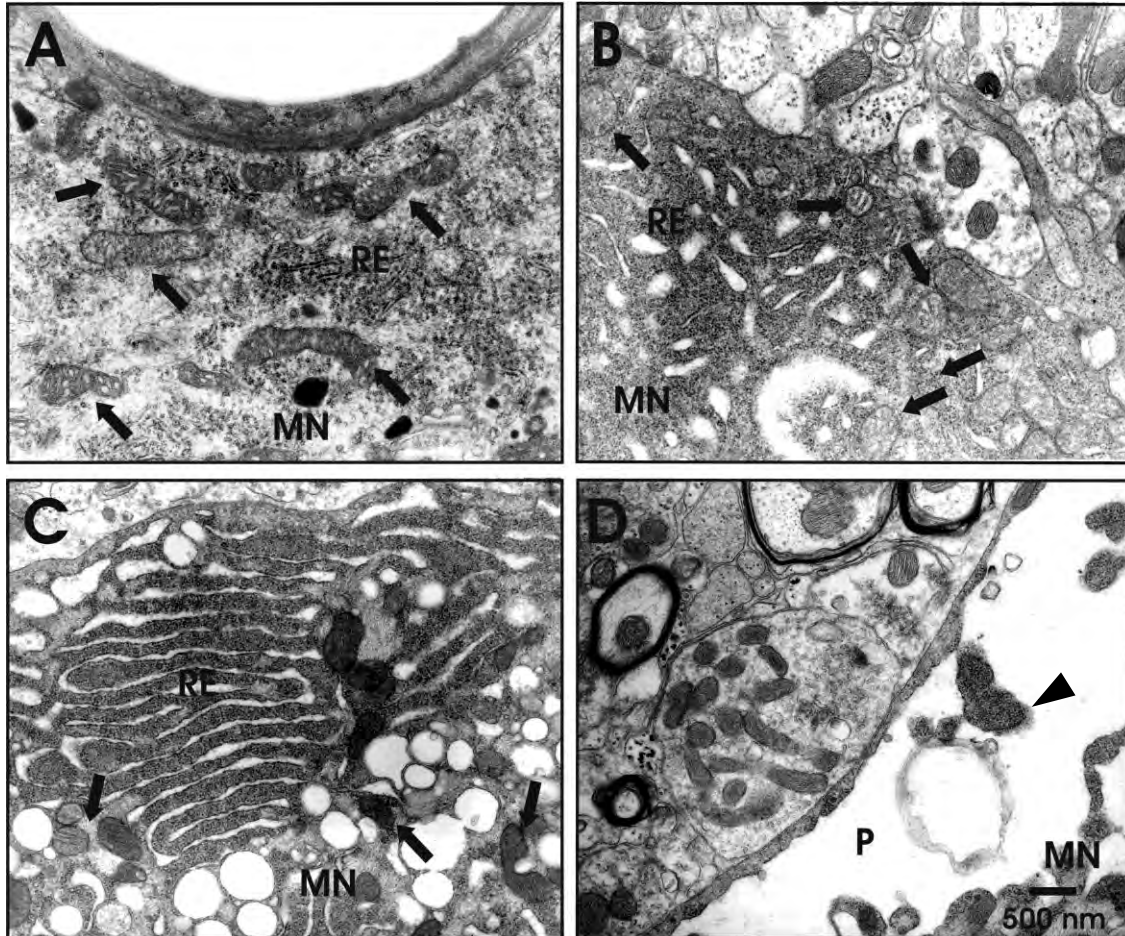


Figura 16. Micrografías electrónicas de las alteraciones particulares para cada etapa degenerativa de las MNs durante el tratamiento crónico con AMPA. A) morfología y tamaño normal de las mitocondrias y el retículo endoplásmico (RE), perfusión de medio Krebs. B) Primera etapa: el RE comienza a hincharse. C) Segunda etapa: se observa una gran cantidad de vacuolas en el citoplasma de las MNs. D) tercer etapa: aparecen las pozas (P) en las orillas de las MNs. La cuarta etapa es caracterizada por la presencia de una gran cantidad de células de tipo macrófago (ver figura 15-D). Las flechas indican las mitocondrias; El triángulo en D muestra un fragmento de citoplasma dentro de la P.

En el día 1 después del implante, las MNs del lado ipsilateral se encuentran en la etapa 1, mientras que las del contralateral no tienen alteraciones. En el día 2 después del implante la mayoría de las MNs del lado ipsilateral se encuentran en la segunda etapa y algunas otras en la cuarta etapa. Las MNs del lado contralateral se encuentran en la primera (Figura 17). En el día 3 después del implante, la mayoría de las MNs restantes del lado ipsilateral se encuentran en la etapa 3 y 4,

mientras que las del lado contralateral se encuentran en su mayoría en la etapa 2 y 3 (Figura 18). Para el cuarto día después del implante, en el lado ipsilateral prácticamente no quedan MNs y si las hay se encuentran en la etapa 4. Del lado contralateral la mayoría de las MNs restantes se encuentran en la etapa 4. Finalmente, en el día 5 no hay MNs en ninguno de los lados de la médula espinal (Figura 19).

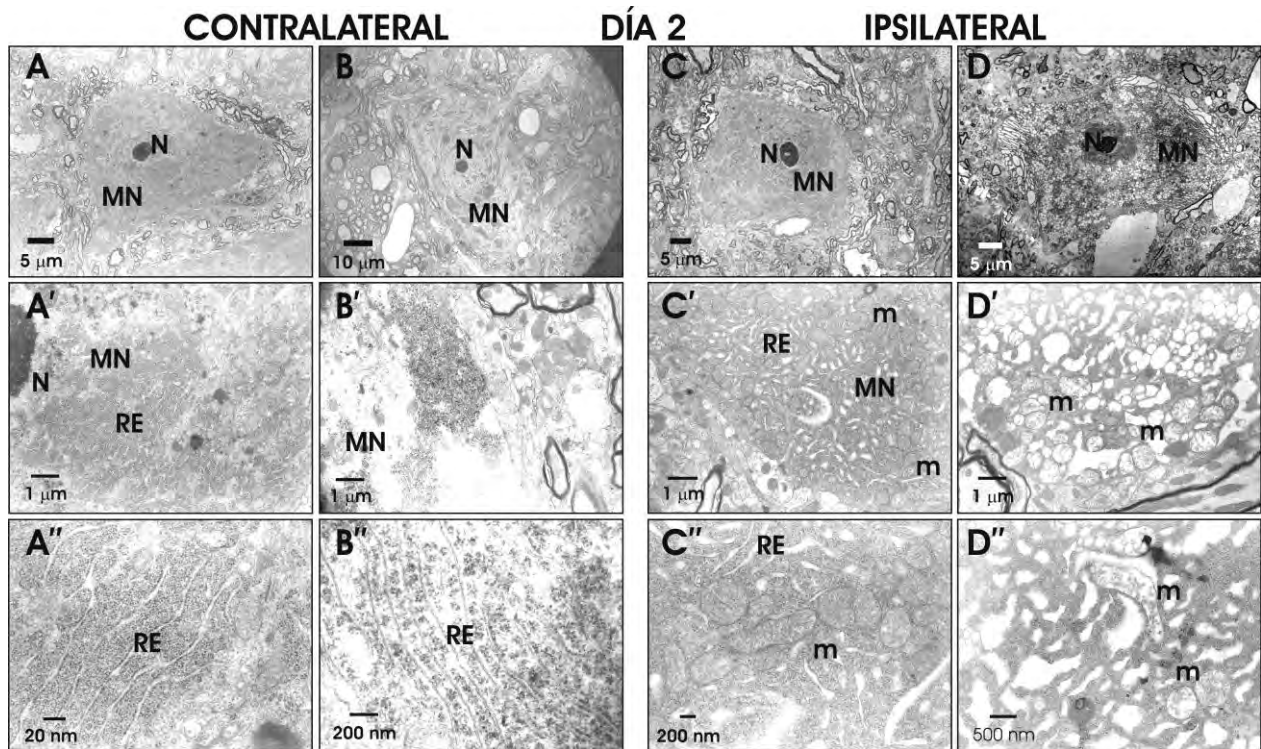


Figura 17. Micrografías electrónicas representativas del segundo día después del implante de la minibomba osmótica. En A y B se presentan dos MNs del lado contralateral en la primera etapa degenerativa. Las micrografías de A', A'', B' y B'' son regiones de las MNs de A y B tomadas a mayor aumento. En C y D se muestran dos MNs del lado ipsilateral. C corresponde a la segunda etapa y D a la tercera. Los superíndices de cada letra son micrografías a mayor aumento para cada MN. En A'', B'', C', D'' se puede apreciar el hinchamiento del retículo endoplásmico (RE), así como las mitocondrias (m).

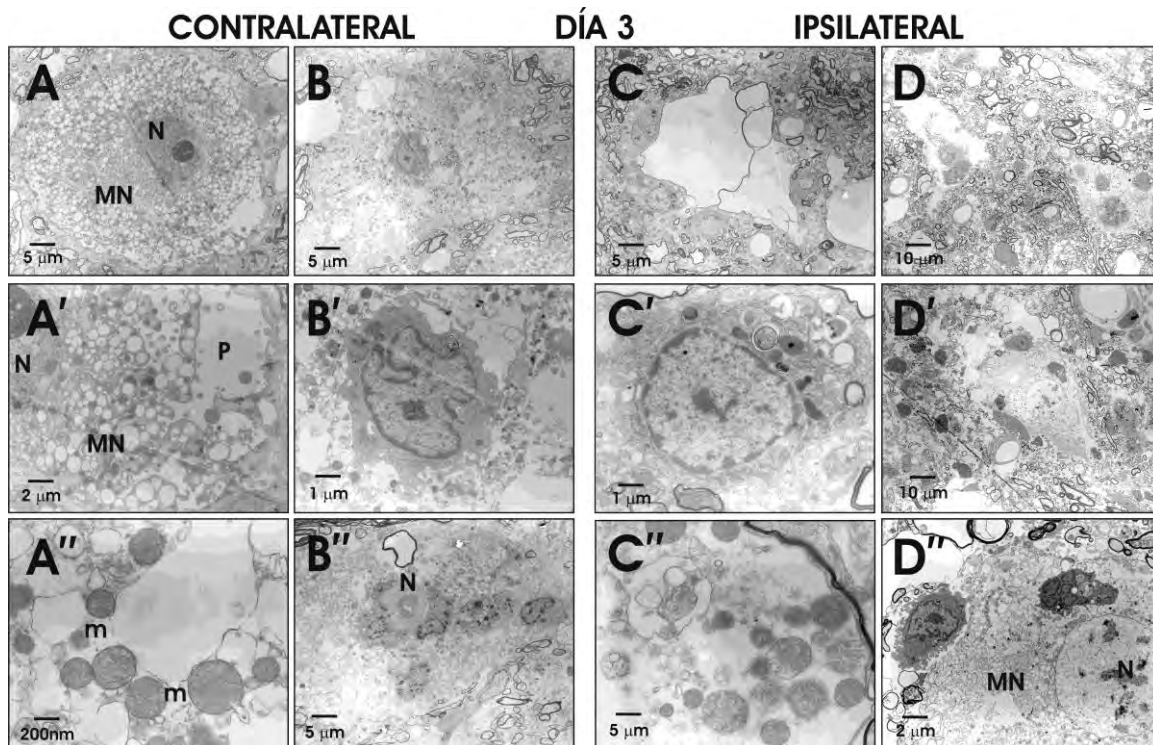


Figura 18. Micrografías electrónicas representativas del tercer día después del implante de la minibomba osmótica. En A se presenta una MN del lado contralateral en la tercera etapa degenerativa. A', A'' son aumentos de esta MN, note la presencia de las pozas (P). En B y B' se presentan los restos de una MN (cuarta etapa), B'' es un aumento de la célula de menor tamaño en B'. En el lado ipsilateral (C y D) solo se encuentran los restos de MNs (cuarta etapa) y se observan varias células de menor tamaño en los restos de las MNs (D y D'). C' y D'' muestran micrografías a mayor aumento de las células de menor tamaño. N señala el núcleo de las MNs.

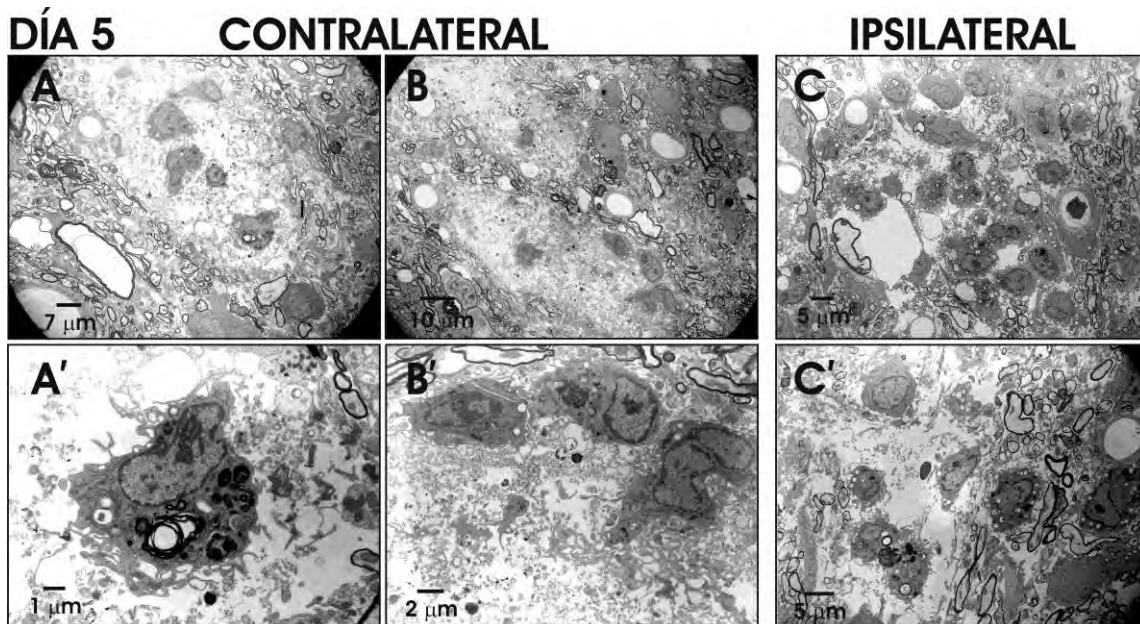


Figura 19. Micrografías electrónicas representativas del quinto día después del implante de la minibomba osmótica. En este día de la parálisis no se encuentran MNs en ambos lados de la médula espinal y se observa una gran cantidad de células de menor tamaño (~10 μm) en los restos de las MNs.

Un organelo de gran importancia para el buen funcionamiento celular es la mitocondria, ya que en condiciones normales está involucrada en la producción de energía. Sin embargo, en condiciones patológicas puede actuar como inductor de los procesos deletéreos que llevan a la muerte celular por apoptosis, a través de la activación de su vía intrínseca.

Durante el proceso degenerativo de las MNs en este modelo distinguimos dos poblaciones de mitocondrias presentes en una misma MN. Una de estas poblaciones sufre un rearrreglo de su membrana interna, mientras que la otra población de mitocondrias no presenta alteraciones (Figura 20).

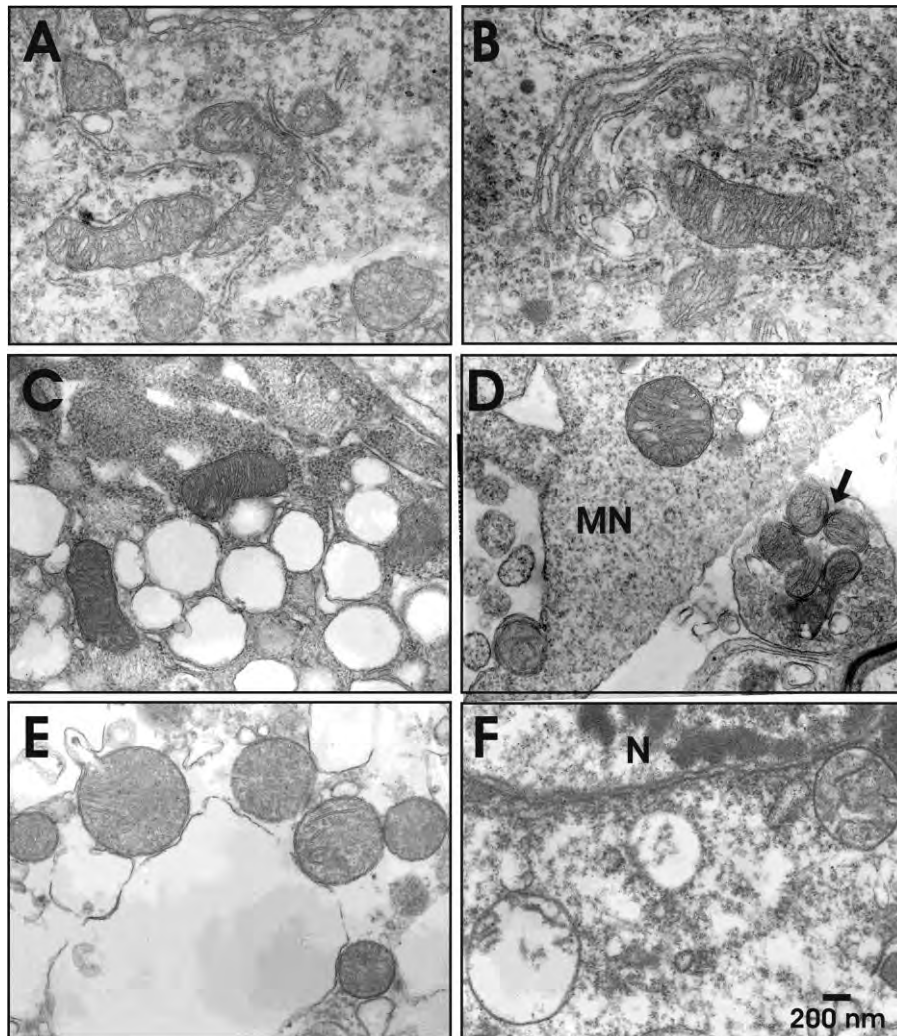


Figura 20. Alteraciones ultraestructurales de las mitocondrias en el modelo crónico. La micrografía de A es representativa del grupo control (medio Krebs). En la primera etapa degenerativa (B), la mayoría de las mitocondrias presentan una morfología normal. Durante la segunda etapa (C), caracterizada por las vacuolas, la mayoría de las mitocondrias preservan una morfología normal. En la tercera etapa (D) aún se observan mitocondrias normales, sin embargo, la gran mayoría se encuentran hinchadas o con su membrana interna vesiculada. En la cuarta etapa (E y F), en los restos de las MNs se pueden encontrar mitocondrias hinchadas (E) y mitocondrias lisadas (F). Estas alteraciones mitocondriales son exclusivas de las MNs, en D se marcan con una flecha a un grupo mitocondrias con morfología normal en una terminal sináptica. N: núcleo de la MN.

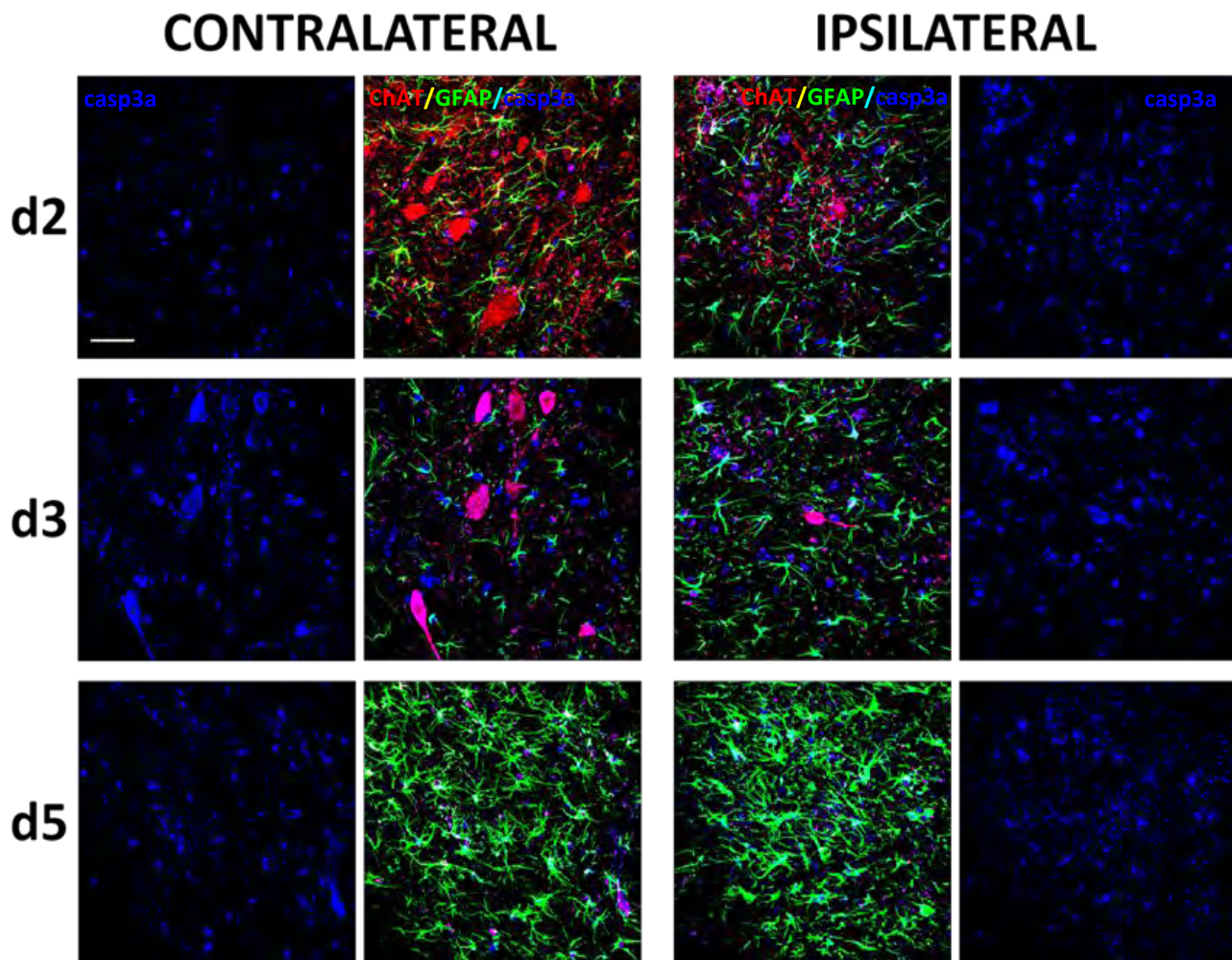


Figura 21. La perfusión crónica de AMPA induce la aparición de la casp3a durante el progreso de la parálisis. Micrografías representativas de los días 2 (d2, N=8), 3 (d3, N=5) y 5 (d5, N=7) de las MNs del asta ventral marcadas para colina acetiltransferasa (ChAT; rojo) y casp3a (azul). También se marca la reacción de glial con la identificación de la proteína ácida de la glia fibrilar (GFAP; verde). La expresión de la casp3a en las MNs (rosa) inicia en el lado ipsilateral y se extiende hacia el contralateral. Algunos procesos de la glia son marcados también con la casp3a (azul turquesa) desde el segundo día después del implante.

La proporción de mitocondrias alteradas varía según la etapa degenerativa de cada MNs, conforme más dañada este la MN, mayor es la proporción de mitocondrias alteradas. No obstante, durante las etapas previas a la disolución celular (etapa 2 y 3; incisos C y D respectivamente de la figura 20), cuando las MNs presentan una gran cantidad de vacuolas o P, aun se observa un gran número de mitocondrias sin alteraciones y además, las que están hinchadas o con su MIM alterada se rompen solo hasta después o durante la disolución celular (etapa 4), por ello es posible encontrar mitocondrias sanas o sin reventar en los restos de las MNs (Figura 20-E y F). Ambas poblaciones de mitocondrias son importantes características a considerar en la determinación del proceso de

muerte de las MNs, puesto que la población de mitocondrias con alteraciones morfológicas puede estar relacionada con el proceso de muerte celular de las MNs, mientras que la segunda nos indica que dicho proceso deletéreo ocurre en condiciones de producción de energía. Además, se podría pensar en que existe un tipo de mitocondrias que posee una mayor resistencia al daño por excitotoxicidad.

Para determinar la participación de la casp3a en la muerte de las MNs en este modelo realizamos ensayos de inmunocitoquímica para detectar la forma activa de esta enzima en las MNs. Estos ensayos de inmunocitoquímica demuestran la aparición de la casp3a durante el proceso de muerte de las MNs. La casp3a se observó en los días 2 (N=8), 3 (N=5), 4 (N=6) y 5 (N=7) después del implante de la bomba ALZET. La expresión de esta enzima inició en el lado ipsilateral (día 2) y progresivamente se extendió hacia el lado contralateral (día 3) decreciendo la intensidad de su marca en el lado ipsilateral. Para los últimos días del progreso de la parálisis (d4 y d5) en las MNs restantes no se detectó la marca de la casp3a (Figura 21). Un aspecto importante a considerar es que no todas las MNs de un mismo corte presentan la expresión de la casp3a, sino que puede haber MNs (en el mismo corte) que no expresan la casp3a (Figura 22).

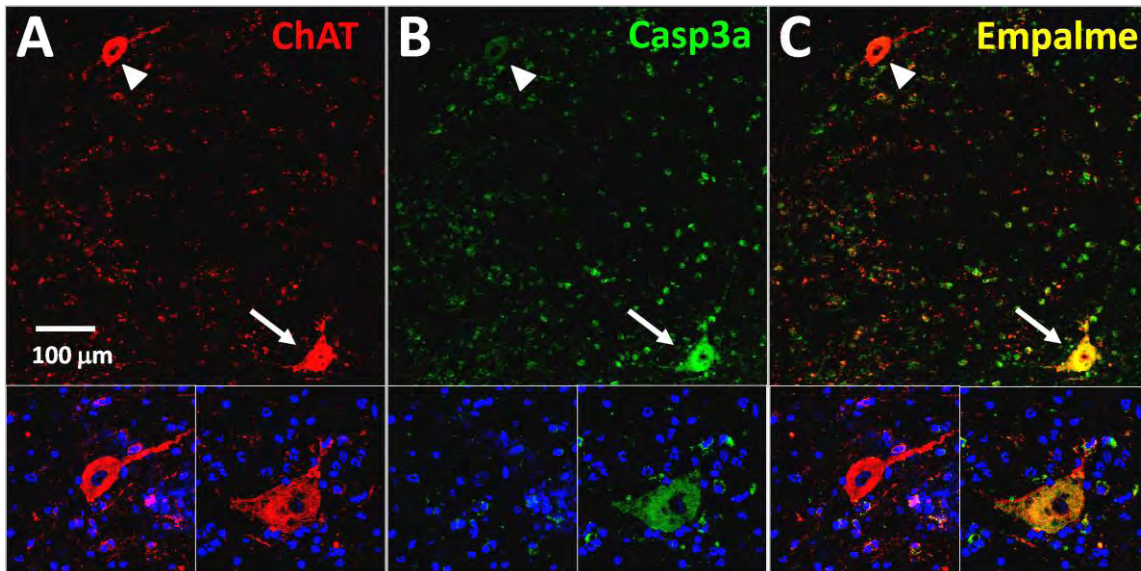


Figura 22. La casp3a no se aparece en todas las MNs. Micrografías de fluorescencia para ChAT (rojo), casp3a (verde) y DAPI (azul, núcleo). El triángulo indica una MN que no expresa la casp3a, la flecha indica una MN que expresión la casp3a. En la parte inferior de cada letra se muestra un acercamiento para cada MN.

Sección III. Efecto del bloqueo farmacológico agudo y crónico de los circuitos inhibitorios de GABA y glicina en la médula espinal de rata

La actividad neuronal de los circuitos motores de la médula espinal está controlada por la interacción de diversos NTs, dentro de los cuales el GABA y la Gly junto con sus receptores son los encargados de

controlar los circuitos inhibitorios. La actividad postsináptica del GABA está mediada principalmente por el receptor para GABA tipo A (GABAAR), mientras que la actividad de la Gly ocurre a través de GlyRs. Mediante la aplicación intramedular de bicuculina (Bic), un antagonista de la actividad GABAérgica y de estricnina (Stry), un antagonista glicinérgico, bloqueamos la inhibición de los circuitos intramedulares, favoreciendo así un estado de hiperexcitabilidad en la médula espinal.

Bloqueo agudo de los circuitos inhibitorios en la región lumbar de la médula espinal

Cuando bloqueamos la transmisión sináptica inhibitoria de manera aguda mediante la microdiálisis de Bic (1 y 5 mM) observamos un efecto conductual dosis dependiente. La concentración de 1 mM provocó al despertar de la anestesia, la aparición de pequeños temblores y contracciones de la extremidad ipsilateral. En cambio, el efecto de la aplicación de Bic 5 mM inició durante la anestesia, indicado por la contracción de la pata ipsilateral ante estímulos mecánicos. Al despertar de la anestesia, los músculos de la extremidad ipsilateral permanecieron contraídos por un periodo de 40-60 min (Figura 23-A). Durante este intervalo de tiempo, las ratas presentaron contracciones generalizadas y “sacudidas de rata mojada”. Después de 90 min el efecto de Bic se dejó de observar y las ratas se comportaron de manera normal. Sin embargo, la aplicación de Stry (1 y 5 mM) no generó un efecto notorio. Aparentemente las ratas se encontraban normales y solo presentaban pequeñas sacudidas de manera esporádica. Finalmente, cuando aplicamos simultáneamente ambos antagonistas a una concentración de 5 mM, el efecto observado fue semejante en características y duración al producido por la Bic 5 mM. En la tabla 1 se muestra un resumen de los grupos experimentales realizados.

TABLA 1: Grupos experimentales para la microdiálisis				
Grupo	Antagonista	[mM]	N	Efectos
1	Bicuculina	1	5	Pequeños temblores y contracciones de la extremidad ipsilateral
2	Bicuculina	5	5	Respuesta a estímulos (anestesiada) Rigidez de los músculos de la pata ipsilateral Contracciones generalizadas y sacudidas de rata mojada
3	Estricnina	1	5	Pequeñas sacudidas
4	Estricnina	5	5	Pequeña sacudidas
5	Bicuculina & Estricnina	5	5	Respuesta a estímulos (anestesiada) Rigidez de los músculos de la pata ipsilateral Contracciones generalizadas y sacudidas de rata mojada

Tabla 1. Resumen de los grupos realizados para el estudio del efecto de la microdiálisis de bicuculina y estricnina en la región lumbar de la médula espinal de rata.

La aplicación aguda de los antagonistas de GABA y Gly no provocó alteraciones de la actividad motriz medida a través de la prueba del Rotarod a 3, 24, 72 y 168 h después de la microdiálisis (Figura 23-C). El conteo de las MNs mediante la tinción de violeta de cresilo corroboró lo observado en las pruebas conductuales, ya que ninguno de los antagonistas indujo la pérdida de MNs en el sitio de la perfusión (figura 23-D). Además, el doble marcado por inmunocitoquímica (7 días) para la ChAT y para la GFAP demostró que ningún tratamiento disminuyó la población de MNs, ni generó una reacción glial en el asta ventral ipsilateral (Figura 24).

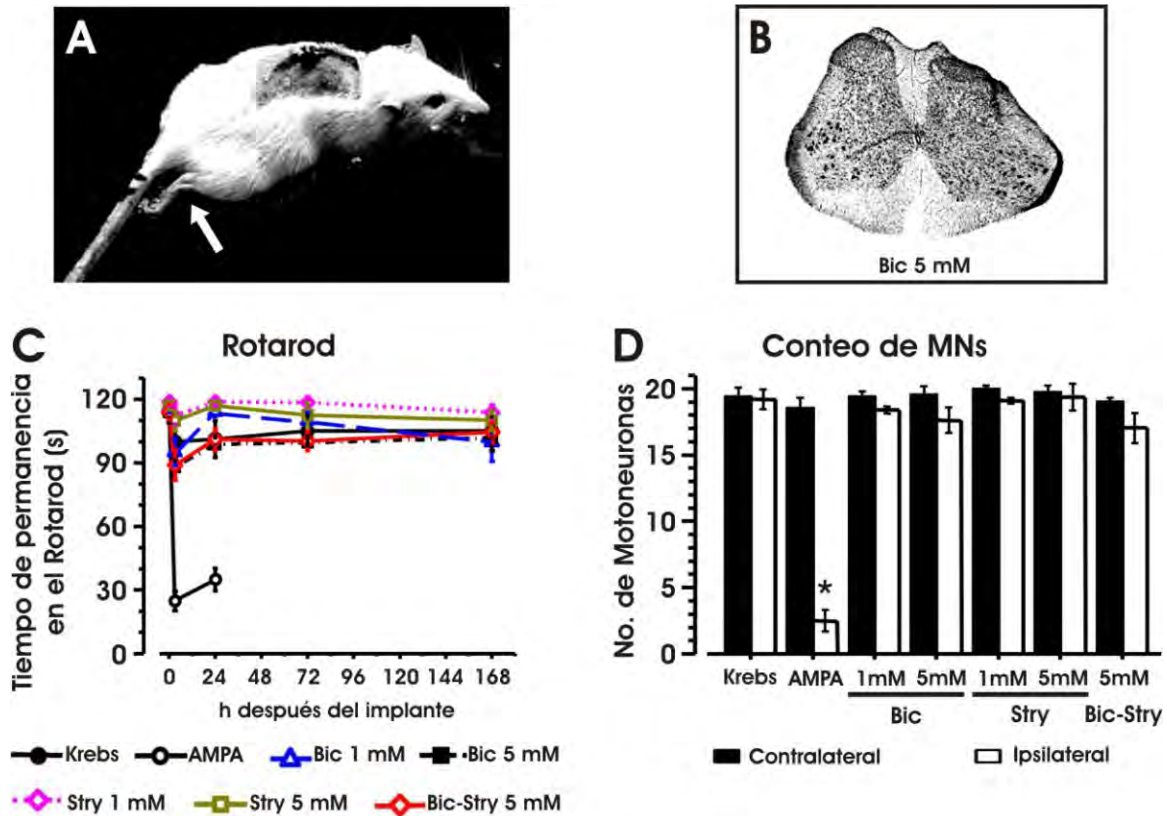


Figura 23. Efecto de la perfusión aguda de Bic, Stry o la aplicación simultánea de ambas. La aplicación de Bic sólo o en combinación con Stry provocó un efecto transitorio caracterizado por la contracción de los músculos de la pata ipsilateral (duración de 45-60 min; flecha en A). Sin embargo, la aplicación de Stry sólo no produjo efectos. Ningún tratamiento disminuyó la cantidad de MNs cuantificadas a los 7 días. Únicamente la perfusión de AMPA provocó la pérdida de MNs cuantificada 24 h después de la microdiálisis de AMPA (D). Correlacionado con la cantidad de MNs, la prueba del Rotarod (C) no mostró cambios, excepto para el grupo tratado con AMPA. B) Tinción de violeta de cresilo en un corte transversal de la médula espinal representativo del grupo tratado con Bic 5 mM, note que la cantidad de MNs en las astas ventrales es la misma.

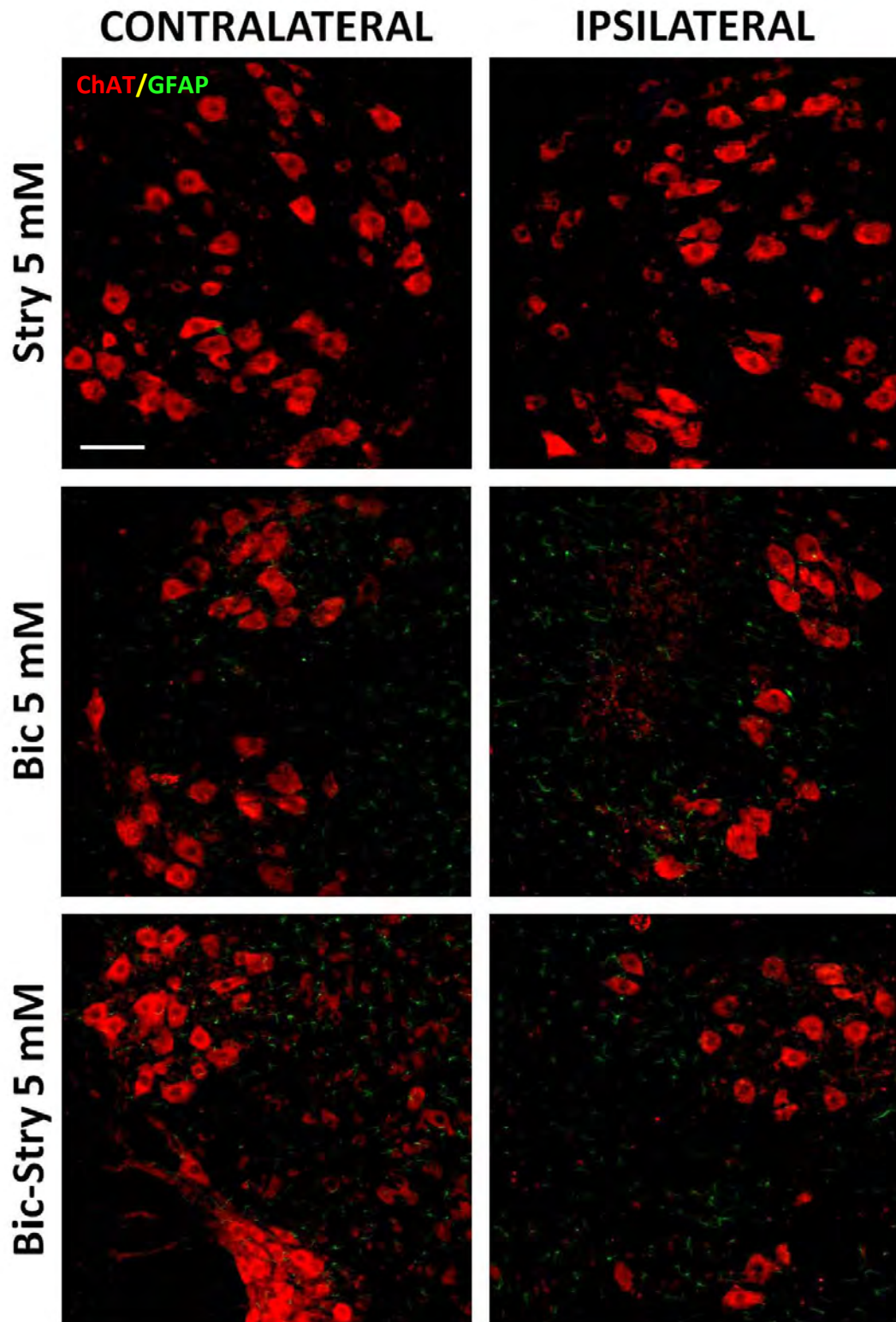


Figura 24. Micrografías representativas de inmunohistoquímica para ChAT (MNs; rojo) y GFAP (glia; verde). La perfusión aguda de Bic, Stry o ambos bloqueadores no indujo la muerte de las MNs ni tampoco una astrogliosis en la región lumbar de la médula espinal de rata (7 días después de la microdialisis). Barra de escala de 100 μ m.

Bloqueo crónico de los circuitos inhibitorios en la región lumbar de la médula espinal

Por otra parte, mediante el uso de minibombas osmóticas aplicamos de manera crónica los antagonistas inhibitorios en la médula espinal. La severidad del efecto provocado por la perfusión crónica de la Bic fue dosis dependiente. La aplicación crónica de Bic, provocó los siguientes efectos (ordenados de menor a mayor severidad): acicalamiento continuo hasta dejar sin pelo el muslo ipsilateral, mordidas y llagas en el cuarto trasero y muslo ipsilateral (Bic 5 y 10 mM), contracción de todos los músculos de la pata ipsilateral (Bic 10 mM), contracciones generalizadas acompañadas de todos los efectos anteriores y en ocasiones la muerte (Bic 17.5 mM).

La latencia de inicio del efecto de la Bic (indicada por la primer contracción o acicalamiento de la pata ipsilateral) fue dosis dependiente, siendo que a menor concentración mayor tiempo de latencia, y viceversa. Las ratas que recibieron la perfusión de Bic 5 mM tardaron 5 días (120 ± 7.6 h) en mostrar el efecto del fármaco. Mientras que los animales que recibieron la administración de Bic 10 mM, mostraron el inicio del efecto entre el segundo y tercer día (57.6 ± 12.3 h) después del implante de la minibomba. De los seis animales que recibieron la concentración más elevada (Bic 17.5 mM), tres sobrevivieron y tres fallecieron durante el efecto de la Bic después de haber presentado contracciones generalizadas. La latencia de inicio en esta concentración fue de 23.5 ± 0.5 h después del implante (Figura 25-A, barras negras). Por otro lado, la duración del efecto producido por Bic fue inversamente proporcional a su concentración. El efecto de la mayor concentración (Bic 17.5 mM) duró menos de 24 h. Después de este tiempo los animales se recuperaron de manera progresiva y no volvieron a presentar efectos. La concentración de Bic 10 mM provocó un efecto más duradero, manteniéndose hasta por cuatro días después de su inicio, al término de este tiempo las ratas no volvieron a presentar efectos. La mayor duración del efecto de la Bic fue observada en la dosis más baja (5 mM), la cual permaneció hasta por cinco días (Figura 25-A, barras blancas).

Respecto al número de MNs encontramos que hay una reducción significativa que depende de la concentración de Bic aplicada (15.39 ± 1.21 , 5 mM; 12.13 ± 0.65 , 10 mM; 13 ± 0.58 , 17.5 mM). Sin embargo, la pérdida de estas MNs no fue suficiente para afectar la ejecución de las pruebas motrices evaluadas. Algunos animales de los grupos de Bic 5 mM (3 de 6) y 10 mM (3 de 6) desarrollaron una deficiencia motriz permanente, caracterizada por la parálisis del dedo meñique del cuarto trasero ipsilateral, lo cual provocó que los animales ya no lo extendían ni apoyaban al caminar. Esta deficiencia no se reflejó en la mayoría de las pruebas motrices evaluadas (Rotarod y PGE; figura 26).

Únicamente se apreció en el registro de las huellas (Figura 27-B' y B''). En ningún caso observamos un progreso en la gravedad del déficit motriz.

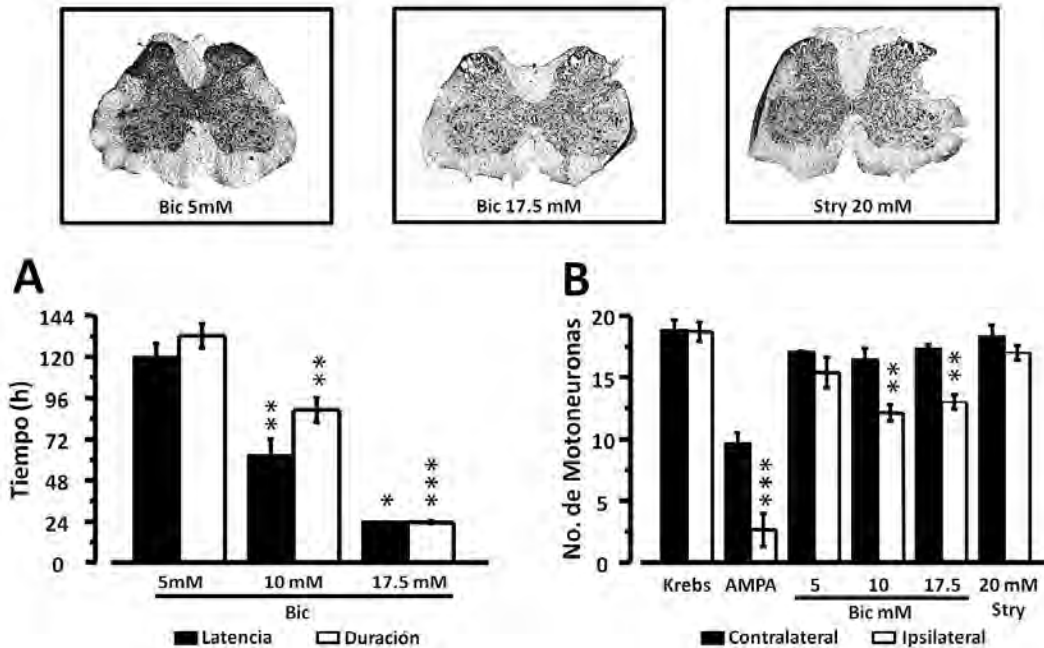


Figura 25. Efecto de la aplicación crónica de Bic o Stry mediante el uso de bombas osmóticas. A) La latencia (barras negras) de inicio del efecto de la Bic (indicada por la primer contracción ó el acicalamiento de la pata ipsilateral, después del implante) disminuyó significativamente de acuerdo con la concentración, a mayor concentración, menor tiempo de latencia. Por su parte, la duración (barras blancas) del efecto de la Bic fue menor significativamente, conforme se incrementa la concentración, a mayor concentración menor duración. B) Conteo de las MNs (8 cortes por rata) para los diferentes grupos: Krebs (N=7), AMPA (día 3, N=7), Bic 5mM (día 12, N=6), 10 mM (día 16, N=6), 17.5 mM (día 10, N=3), Stry 20 mM (día 11, N=3). Únicamente los tratamientos con Bic (10 y 17.5 mM) y AMPA disminuyeron significativamente el número de MNs (respecto a su lado contralateral). En la parte superior se muestran cortes transversales representativos de los grupos de Bic 5 mM, 17.5 mM y Stry 20 mM teñidos con violeta de cresilo. ***: P < 0.0001; **: P < 0.001; *: P < 0.01

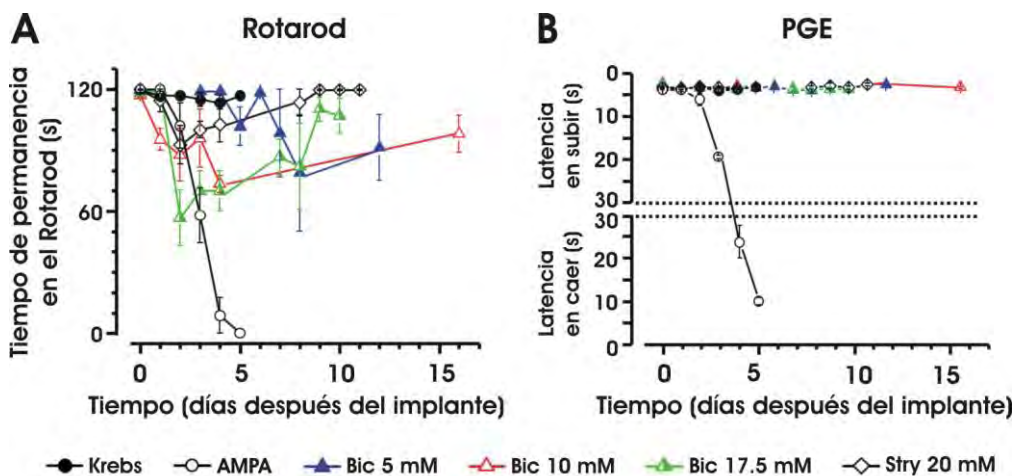


Figura 26. Evaluación de la conducta motriz para los grupos tratados de manera crónica con Bic y Stry. A) Curso temporal de la prueba del Rotarod para los grupos que recibieron la perfusión crónica de Bic ó Stry. Ninguno de estos fármacos provocó una deficiencia en la realización de esta prueba. B) Curso temporal de la prueba de PGE de ratas tratadas crónicamente con Bic ó Stry. Todas las ratas escalaron la rejilla en un tiempo menor a 3 s. Únicamente las ratas tratadas con AMPA (círculos blancos) desarrollaron un déficit motriz permanente. Krebs (N=7), AMPA (N=7), Bic 5 mM (N=6), 10 mM (N=6), 17.5 mM (N=3), Stry 20 mM (N=3).

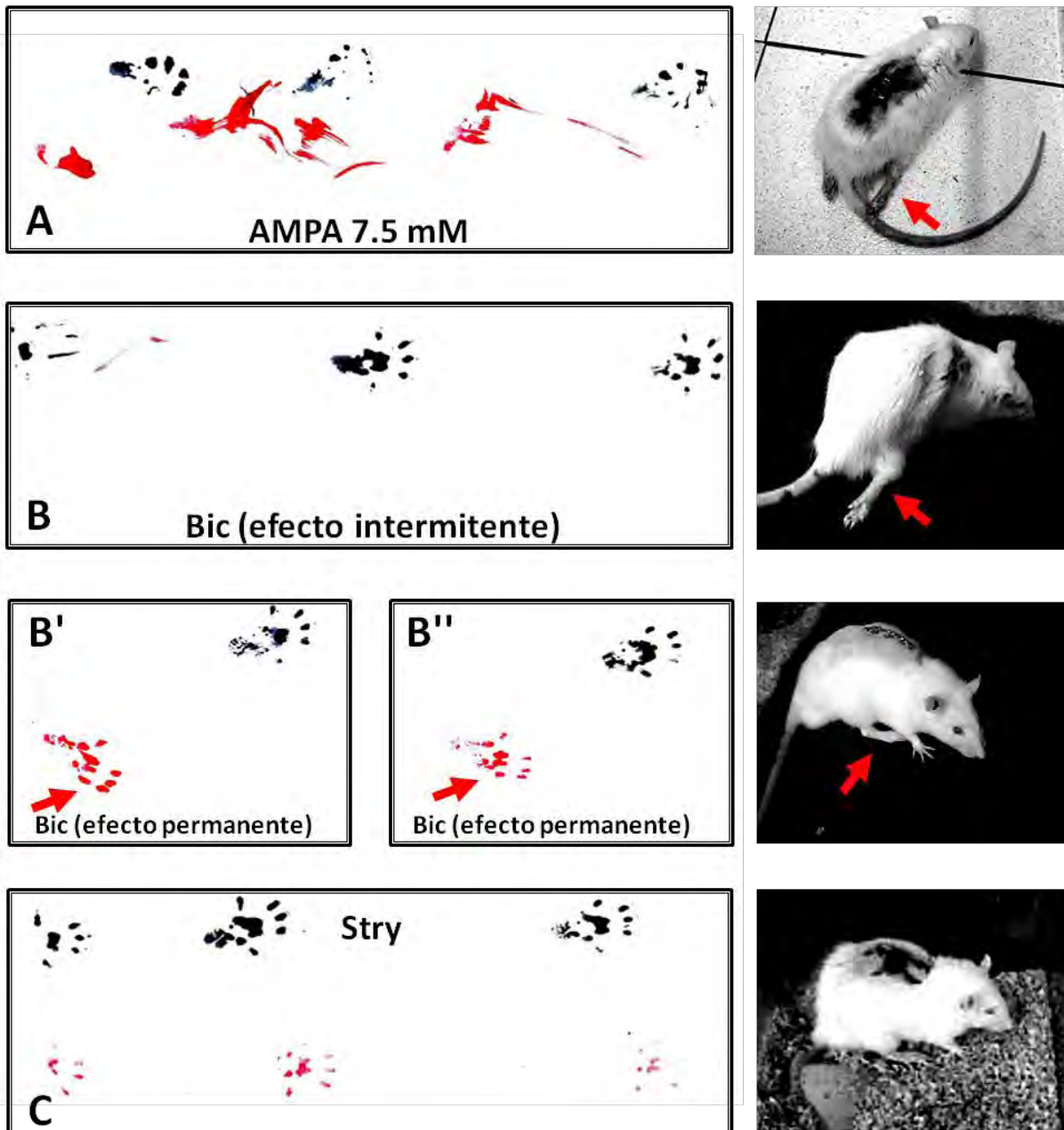


Figura 27. Registros representativos del patrón de huellas para los grupos de AMPA, Bic y Stry. A) Registro del patrón de huellas en el día 3 de la aplicación del AMPA. La pata ipsilateral (rojo) se encuentra paralizada totalmente y es arrastrada. En la pata contralateral (negro) se aprecian los síntomas iniciales de la parálisis, los dedos no están extendidos. B) Patrón de huellas durante el efecto intermitente de Bic, la rata levanta la pata ipsilateral al caminar por lo cual las huellas de esta pata no se ven, este efecto se presentó de manera intermitente durante varios días (4 días para Bic 10 mM y 5 días para Bic 5 mM) y su duración fue de 40-50 min. La aplicación de Bic 5 y 10 mM produjo un efecto permanente caracterizado por la parálisis del dedo meñique de la pata ipsilateral (flecha en B' y B''). C) La aplicación de Stry no mostró ningún efecto significativo. A la derecha se muestran fotos representativas para cada grupo, las flechas indican la pata ipsilateral.

Los síntomas iniciales en la parálisis inducida por la aplicación de AMPA, se caracterizan por la aparición de pequeñas contracciones en la pata ipsilateral, la cual progresivamente va quedando extendida y paralizada, en consecuencia las ratas arrastran la pata al caminar (Figura 27 A). Finalmente, la parálisis se extiende hacia el lado contralateral dejando paralizadas ambas extremidades traseras. Uno de los efectos provocados por la perfusión crónica de Bic fue la contracción de los músculos de la pata ipsilateral, provocando que quedara totalmente extendida. Sin embargo, cuando las ratas caminaban eran capaces de levantar la pata ipsilateral sin dejarla arrastrar. Además, en el caso de la Bic el efecto observado en la pata ipsilateral fue intermitente y no se propagó a la pata contralateral (figura 27-B).

Los ensayos de inmunohistoquímica realizados a 12 (Bic 5 mM), 16 (Bic 10 mM), 10 (17.5 mM) y 11 (Stry) días después del implante demostraron que la aplicación crónica de Bic provocó una discreta disminución significativa en la población de MNs con marca positiva para la ChAT del lado ipsilateral, siendo más evidente en la concentración de 17.5 mM. Sin embargo, la aplicación crónica de Stry no causó ninguna alteración en el número de MNs marcadas para la ChAT. Ningún tratamiento disminuyó la cantidad de MNs marcadas positivamente para la ChAT en el lado contralateral. En el lado ipsilateral el marcado de la GFAP (usada como indicadora de gliosis) demostró que la aplicación crónica de Bic indujo una reacción de astrogliosis dependiente de la concentración, es decir, la concentración de 17.5 mM de Bic provocó una astrogliosis mayor. Por su parte la aplicación crónica de Stry también produjo un incremento en la expresión de la GFAP. Sin embargo, esta reacción de glial puede deberse al daño provocado por la cánula del implante, note en la figura 28, que la GFAP se encuentra principalmente en el sitio del implante (asta dorsal), siendo casi nula en las zonas en donde se encuentran las MNs (asta ventral). En todos los grupos el incremento en el marcaje de la GFAP solo se presentó en el lado ipsilateral. Estos resultados sugieren que el bloqueo crónico de los circuitos inhibitorios de la médula espinal (principalmente GABAérgicos) es capaz de provocar la muerte de las MNs espinales.

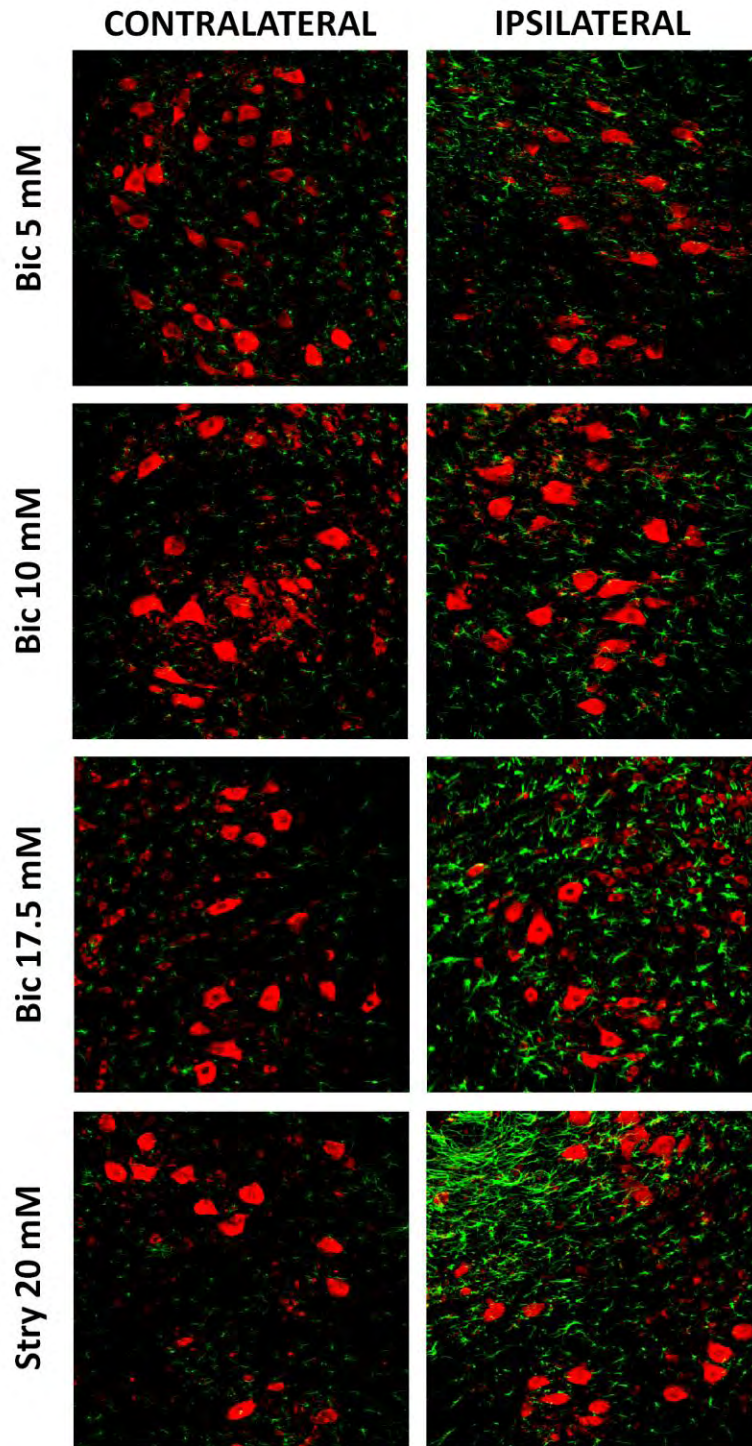


Figura 28. La perfusión crónica de Bic provocó una ligera disminución de las MNs positivas para la ChAT y además una astrogliosis dependiente de la concentración, siendo más severas en la mayor concentración y solo en el lado ipsilateral. La aplicación de Stry no disminuyó la cantidad de MNs.

Discusión

Los resultados de esta tesis demuestran la reproducibilidad de los modelos de degeneración espinal aguda (Corona y Tapia, 2004) y crónica (Tovar-y-Romo et al., 2007) basados en la sobreactivación de los receptores AMPA, ambos modelos desarrollados en nuestro laboratorio. La aplicación aguda de AMPA (6 mM) ó crónica (7.5 mM) produce la parálisis de los cuartos traseros, de modo ipsilateral ó bilateral, respectivamente, semejante a la observada en modelos transgénicos de ELA del tipo familiar en rata y ratón (Gurney et al., 1994; Nagai et al., 2001; Matsumoto et al., 2006).

Participación de la astrogliá durante la muerte de las MNs espinales inducida por excitotoxicidad

Una característica histopatológica de la ELA es la presencia de astrogliá activada, tanto en modelos de roedores (Alexianu et al., 2001; Feeney et al., 2001; Hall et al., 1998) como en seres humanos con ELA (Kushner et al., 1991; Nagy et al., 1994; Schiffer et al., 1996; Schiffer y Fiano, 2004). En este trabajo también identificamos esta característica de la ELA, a través de pruebas de inmunocitoquímica para detectar la GFAP. Demostramos que en el modelo agudo, al igual que en el crónico (Tovar-y-Romo et al., 2007), la aplicación de AMPA induce una astrogliosis alrededor del espacio de las MNs perdidas del lado ipsilateral.

Por otra parte, diversos trabajos han demostrado la participación de células no neuronales como agentes inductores de los procesos deletéreos de las MNs durante la ELA. Además, múltiples propiedades como la expresión de genes, la proliferación de células postmitóticas y deficiencias en los sistemas de recaptura (Sofroniew, 2005) de los astrocitos de la médula espinal y del cerebro están involucrados en la ELA (Maragakis y Rothstein, 2006, 2004). Estas funciones aberrantes de los astrocitos que rodean el soma y dendritas de MNs favorecen el progreso de la ELA. De hecho, se ha propuesto que la deficiencia en las funciones de los astrocitos es más importante que su proliferación para el desarrollo la ELA. (Lepore et al., 2008), aunque en algunos trabajos se ha demostrado que el incremento de la proporción de células no neuronales sanas (como los astrocitos) está inversamente relacionado con la severidad de la enfermedad y con la sobrevivencia de los animales (Clement et al., 2003).

Además de los astrocitos hay otras células no neuronales involucradas en la etiología de esta enfermedad. Recientemente se ha demostrado que la activación de la microglía juega un papel importante en el inicio y progresión de la ELA (Sargsyan et al., 2005), probablemente a través de la vía del Factor de Necrosis Tumoral (TNF α ; Sanagi et al., 2010). Se ha demostrado que la minociclina, un compuesto de tetraciclina que bloquea la activación de la microglia, retrasa el inicio

de la enfermedad y prolonga el tiempo de vida de los ratones transgénicos SOD G37R (Kriz et al., 2002). Por otra parte, también se demostró que la eliminación selectiva de la expresión de la SOD1 mutante en la microglia retrasa la progresión de la enfermedad en ratones que expresan la SOD1 mutada (Boillee et al., 2006).

Actualmente es conocido que la activación de los astrocitos y de la microglia son eventos paralelos al inicio y progreso de la ELA (Hall et al., 1998). Además, recientemente se demostró que previo a la activación de los astrocitos en etapas presintomáticas en el ratón G93A, ocurre un aumento en expresión de isoforma beta del gen de la calcitonina relacionada a péptidos (β CGRP, calcitonin gene-related peptide) en las MNs (Ringer et al., 2009). La calcitonina es capaz de inducir la activación de los astrocitos *in vivo* e *in vitro* (Reddington et al., 1995) y en cultivos celulares induce una hipertrofia de astrocitos (Lazar et al., 1991), lo cual produce un incremento en el RNAm de la GFAP (Dumoulin et al., 1992). De aquí que Rinder y cols. proponen la expresión de β CGRP como un nuevo marcador molecular de la ELA en una etapa presintomática temprana (Ringer et al., 2009). Sin embargo, Graber y cols. proponen que la activación de la microglía es un mejor marcador histológico que la activación de astrocitos (Graber et al., 2010), ya que ocurre antes.

Detección temprana del daño provocado por la perfusión crónica de AMPA

Una de las ventajas del modelo crónico es la progresión paulatina de la parálisis, puesto que en la enfermedad humana, la parálisis ocurre de manera progresiva y no rápida como en el modelo agudo. Sin embargo, la forma para detectar los síntomas iniciales de la parálisis en este modelo puede ser complicada, debido a que las pruebas del Rotarod y el PGE no muestran cambios significativos en los primeros días (1 y 2) después del implante de la minibomba, aún cuando ya existe una pérdida de MNs en estos días. No obstante, mediante el análisis biomecánico de la zancada (figura 9-C) logramos identificar y cuantificar el inicio de la parálisis, puesto que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas desde las 24 h después del implante, es decir en una etapa presintomática de este modelo. La posibilidad de identificar y cuantificar en nuestro modelo crónico un punto en el cual comiencen los daños celulares y motores sin desarrollar una parálisis, brinda una herramienta muy importante para búsquedas de tratamientos mediante los cuales se logre detener y prevenir la pérdida de MNs, y así poder evitar la parálisis. Debido a que el diagnóstico de la ELA humana es por exclusión, es decir por eliminación de todas las posibles enfermedades conocidas, provoca que cuando se diagnostica, el avance de la enfermedad se encuentra en una etapa muy cercana a la parálisis o bien durante la parálisis. Por ello, es importante identificar alteraciones

previas a la parálisis que ayuden al diagnóstico de la ELA. En esta tesis y por lo menos en nuestro modelo, demostramos que mediante el análisis del patrón de zancada es posible identificar este punto clave en el desarrollo de la parálisis. Sin embargo requerimos realizar más estudios que confirmen estos resultados.

La aplicación aguda de AMPA provoca una muerte celular rápida por necrosis en algunas MNs, y se asocia con la aparición de la casp3a en otras MNs

La perfusión aguda del AMPA indujo un deterioro rápido de las MNs espinales caracterizado por el hinchamiento y ruptura de organelos como las mitocondrias, y finalmente la lisis de las MNs, indicada por las discontinuidades de la membrana celular (3 h después del AMPA). Estas alteraciones en las MNs son consistentes con algunas de las características ultraestructurales principales de la necrosis, como el hinchamiento, la ruptura de membranas, la lisis celular y la invasión de células con características de macrófagos (Martin, et al., 1998). Además, la ausencia de la casp3a en este modelo, y el tiempo en el que ocurren las alteraciones celulares y la muerte de las MNs, definen a esta muerte celular como un proceso necrótico.

El tratamiento agudo de AMPA induce la muerte de aproximadamente el 50% de las MNs del lado ipsilateral en un periodo menor de 3 h. Sin embargo, aun que ya no se perfunda AMPA, el número de MNs continua disminuyendo significativamente, hasta alcanzar su máximo avance a las 24 h después de la perfusión del AMPA. Únicamente después de este tiempo detectamos la casp3a en algunas de las MNs restantes del lado ipsilateral. Este fenómeno es interesante puesto que plantea la posibilidad de que un evento de carácter necrótico puede inducir un proceso de muerte celular por apoptosis en las MNs espinales. La aparición de la casp3a, observada en estas MNs puede ser resultado de la activación de la vía extrínseca de apoptosis, la cual involucra la participación de receptores de muerte, activación de caspasa-8 y la subsecuente activación de la caspasa-3, factores que conllevan a la muerte celular (Orrenius, et al., 2003).

Diversos estudios han demostrado la presencia de Fas (APO-1/CD95; miembro de los receptores de muerte) y FaS (ligando de Fas) en la superficie de diversos tipos celulares del SNC, entre ellos las MNs. Además, se ha demostrado que la presencia de tejido dañado incrementa la expresión de Fas/FaS (Northington, et al., 2001; Choi y Benveniste, 2004; Martin, et al., 2005), facilitando así la inducción de la muerte de neuronas a través de la activación de caspasas (Choi y Benveniste, 2004). Otro aspecto importante que se ha demostrado es que tanto los astrocitos como la microglía son fuentes potenciales de inductores de muerte, como el FasL (Locatelli, et al., 2007), lo

cual es de gran importancia para nosotros, puesto que nuestros resultados muestran que la pérdida de MNs es acompañada de una astrogliosis (indicada por la sobreexpresión de la GFAP) en el lado ipsilateral, la cual se incrementa proporcionalmente con la pérdida de MNs. En este trabajo queda pendiente el estudio de la vía extrínseca de apoptosis, sin embargo, sienta los antecedentes para proponer su posible participación en la muerte tardía de las MNs en este modelo.

Por otro lado, la activación de las calpainas (familia de proteínas cinasas activadas por calcio) también puede conducir a la activación de las caspasas (cistein-proteasas activas por calcio) y con ello provocar una muerte celular por apoptosis. El ejemplo más claro de la activación de caspasas por calpainas, es la activación de la caspasa 12 (Waterhouse, 1998; Nakagawa y Yuan, 2000). Corona y Tapia (2008) demostraron que el bloqueo de la actividad de las calpainas previene la pérdida de MNs en nuestro modelo agudo, demostrando así la participación de enzimas activadas por calcio en la muerte de las MNs. Probablemente, la muerte de las MNs (aproximadamente el 50%) en las primeras horas (1.5-3 h después de la aplicación del AMPA) en el modelo agudo, es un proceso dependiente de la actividad de las calpainas ya que se sabe que la activación prolongada de las éstas puede provocar la degradación de varias proteínas, incluyendo receptores, transportadores y proteínas del citoesqueleto, provocando un daño neuronal que incrementa la susceptibilidad a un efecto tóxico por estimulación (Bi et al., 1998; Guttmann et al., 2002; Araujo et al., 2004; Ray et al., 2003). En este trabajo demostramos que la muerte de las MNs en las primeras horas después del AMPA no se asocia con la detección de la casp3a. Sin embargo, el daño temprano (1.5-3 h) provocado por las calpainas puede ser un factor de inducción de la actividad de las caspasas en etapas tardías (24 h; Figura 14).

En resumen, sugerimos que las MNs que se pierden rápidamente (3-6 h) en el modelo agudo mueren mediante una necrosis rápida, mientras que la muerte de las MNs durante las siguientes 24 h, posiblemente involucre un proceso apoptótico. Queda por definir si la caspasa-3 se activa a través de la vía extrínseca o intrínseca de la apoptosis.

La aplicación crónica de AMPA induce la muerte de las MNs espinales mediante un proceso semejante a una necrosis prolongada que es acompañada de la aparición de la casp3a

El proceso de muerte celular involucrado en la pérdida progresiva de MNs durante la ELA, es un tema que se ha estudiado prácticamente desde que se describió esta enfermedad. Sin embargo, no se han obtenido evidencias concretas que resuelvan esta incógnita. La existencia de un mecanismo de muerte celular apoptótico en la ELA es controversial. De acuerdo con Martin (1999), las MNs en la

ELA pueden morir por apoptosis, pero otros investigadores no confirman esta observación. En modelos transgénicos de ELA de tipo familiar se ha demostrado la participación de la caspasa 1, 3 y 9 (Li et al., 2000; Ohta et al., 2008; Pasinelli et al., 2000; Rossi et al., 2008) durante el progreso de la enfermedad. Al inhibirse la actividad de las caspasas en modelos transgénicos de ELA se logra retrasar el inicio de la enfermedad y prolongar el tiempo de vida de los animales, aunque no se previene totalmente la enfermedad (Li et al., 2000; Ohta et al., 2008). Yamazaki y cols. (2005) investigaron en el tejido de la médula espinal de pacientes muertos por ELA, pero no encontraron cuerpos apoptóticos. Itzecka (2007) encontró en el líquido cerebroespinal de pacientes con ALS una disminución del citocromo c, explicada en razón de la producción de radicales libres y proponiendo su participación en posibles cascadas de señalización apoptótica (Cereghetti y Scorrano, 2006), aunque también podría reflejar la pérdida de mitocondrias neuronales, como hemos descrito en este trabajo. Por otro lado existen grupos de trabajo que han reportado que la muerte de las MNs ocurre mediante un proceso de necrosis prolongada (Bendotti et al., 2001; Chang y Martin, 2009). Hasta ahora ningún grupo de trabajo había integrado los cambios ultraestructurales y la activación de caspasas durante el proceso degenerativo de las MNs. En este trabajo describimos ultraestructuralmente el proceso de muerte de las MNs y su asociación temporal con la detección de la casp3a.

Los resultados obtenidos mediante MET durante la aplicación crónica de AMPA, mostraron que las MNs mueren a través de un proceso degenerativo gradual semejante al descrito en modelos transgénicos de ELA del tipo familiar (Bendotti et al., 2001; Chang y Martin, 2009), caracterizado por el hinchamiento del RE, la aparición de vacuolas en el citoplasma y finalmente la disolución de la membrana celular. Estas alteraciones morfológicas y el tiempo en el que ocurren, ubican a este proceso de muerte como una necrosis de lento progreso.

Durante este proceso degenerativo de las MNs identificamos por MET cuatro etapas (Figura 15). Así mismo, por inmunocitoquímica determinamos la aparición de la casp3a en las MNs. Aunque estas observaciones se realizaron en diferentes animales, gracias a la semejanza en el tiempo después del implante, podemos relacionar ambos conjuntos de información, para así proponer que la aparición transitoria de la casp3a está relacionada con la población de mitocondrias que son alteradas durante el proceso degenerativo de las MNs. Proponemos como mecanismo de activación de la caspasa 3 a la vesiculación de la membrana interna mitocondrial, ya que se conoce que las alteraciones de la membrana interna mitocondrial (MIM) permiten la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c, el cual conlleva a la activación de la caspasa 3 (Li et al., 2000;

Martin et al., 2009; Ohta et al., 2008; Pasinelli et al., 2000). Otro factor que puede estar induciendo la aparición de la casp3a en las MNs en días posteriores al segundo y tercero después del implante, es la vía extrínseca de la apoptosis iniciada probablemente por la activación de la astrogliya y microglia de la médula espinal, lo cual ha sido observado en ratones transgénicos de ELA familiar (Locatelli, et al., 2007).

A pesar de que en las MNs detectamos la casp3a, las MNs terminan por morir mediante un proceso de necrosis de lento progreso. Debido a esto proponemos dos posibles explicaciones para la aparición de la casp3a en las MNs: 1) está involucrada en el inicio e inducción del proceso degenerativo de las MNs ó 2) que es sólo el resultado del daño mitocondrial, sin llegar a tener un papel determinante en el proceso de muerte de las MNs. Un aspecto curioso es que las últimas MNs en morir (en ambos lados de la médula espinal) no muestran la casp3a, por lo que proponemos la posible existencia de un tipo de MNs resistentes a la muerte por sobreactivación del receptor AMPA.

Las mitocondrias podrían tener dos posibles papeles en la muerte de las MNs

Existen evidencias que asocian las alteraciones mitocondriales con una falla energética, y también con la liberación de moléculas proapoptóticas, como el citocromo c, las cuales favorecen los procesos deletéreos en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas como la ELA (Bendotti et al., 2001; Martin et al., 2007, 2009).

En este estudio, se demostró que en una etapa temprana del modelo agudo (1.5 h después de la perfusión del AMPA) previa a la muerte de las MNs, existe un deterioro mitocondrial caracterizado por la vesiculación de la MIM, la cual puede provocar una deficiencia energética. En relación con este punto, en trabajos recientes de nuestro laboratorio, en los cuales se usan sustratos energéticos como neuroprotectores, se ha demostrado que moléculas como el piruvato (que facilitan la producción de energía) al aplicarse de forma simultánea con el AMPA, previenen la pérdida de MNs inducida por la perfusión aguda de AMPA (Santa Cruz, 2009). Con estos resultados y teniendo en cuenta la posible falla energética generada por la vesiculación de la MIM, podemos decir que: 1) se favorece la teoría de que el efecto neuroprotector de los sustratos energéticos se encuentra relacionado con facilitar la producción de energía, puesto que al ser cuerpos cetónicos estos sustratos podrían también participar en la captura de los radicales libres y así disminuir el estrés oxidativo, que también ha sido relacionado con la muerte de las MNs en modelos de ELA familiar, y 2) que la vesiculación de la MIM podría estar generando una falla energética.

Por otro lado, tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis pueden converger en la mitocondria, que al sufrir alteraciones favorece la liberación de moléculas proapoptóticas que conduzcan a la activación de la casp3 (Orrenius et al., 2003). En ambos casos la activación de esta caspasa ocurre después de una alteración mitocondrial, descrita como la vesiculación de la MIM (Martin et la., 2009). Esta vesiculación se ha asociado con cambios en la permeabilidad del complejo del poro de transición mitocondrial, proponiendo este cambio de permeabilidad como el mecanismo que favorece la liberación de moléculas proapoptóticas como el citocromo c, la cual conlleva a la subsecuente activación de la casp3, desencadenando un proceso apoptótico. Nuestros resultados obtenidos por MET muestran que los cambios de la MIM se encuentran temporalmente en etapas previas o al mismo tiempo que la expresión de la casp3a en las MNs (vista por inmunofluorescencia). Con base en estos datos, proponemos que la detección de la casp3 puede ser el resultado de la vesiculación de la MIM.

En resumen sugerimos que la mitocondria puede tener un doble papel en la muerte de las MNs. Por una parte la modificación de MIM puede estar relacionada con una falla energética causante de la muerte de las MNs, y también con la liberación de moléculas proapoptóticas que conduzcan a la activación de la casp3. Finalmente, uno o ambos mecanismos pueden conducir a la muerte de las MNs en ambos modelos experimentales.

Existen dos poblaciones de mitocondrias involucradas en la muerte de las MNs

La mitocondria es un organelo celular estrechamente asociado con los procesos de muerte celular, puesto que tanto en la necrosis como en la apoptosis juega un papel determinante y característico. Durante todo el proceso degenerativo de las MNs en el modelo crónico, se distinguen dos poblaciones de mitocondrias, una de ellas sufre la vesiculación de su membrana interna y la otra permanece sin alteraciones.

En la primer población de mitocondrias, la vesiculación de la membrana interna se presenta desde las 24 h después del implante y podría estar involucrada con la expresión de la casp3a detectada desde las 48 h. Por otro lado, la detección de la casp3a en días posteriores, puede estar relacionada con la vía extrínseca de la apoptosis. Un aspecto relevante es que no todas las MNs (de un mismo corte) presentan la expresión de la casp3. Asimismo, esta vesiculación de la MIM también puede generar una falla energética, que favorezca el proceso de la muerte de las MNs.

Por otro lado, la presencia de mitocondrias morfológicamente sanas indica que el proceso degenerativo de las MNs ocurre en condiciones de producción de energía, al igual que en otros

procesos de MCP. En este estudio no cuantificamos la proporción de cada una de las poblaciones de mitocondrias, sin embargo, este dato podría ser de gran importancia para determinar con mayor claridad el papel de ambas poblaciones de mitocondrias en la muerte de las MNs e incluso podría caracterizar un tipo de mitocondria relacionada con la muerte de las MNs.

Papel funcional de los circuitos GABAérgicos en la médula espinal

El control de la actividad de los circuitos neuronales en la médula espinal se basa en la interacción de diferentes NTs, dentro de los cuales el GABA y la Gly median las sinapsis inhibitorias. Actualmente, las diferencias en la acción de cada uno de estos sistemas sobre el control y coordinación de los movimientos no se ha determinado, puesto que en diversos estudios se ha demostrado que pueden existir terminales presinápticas que coliberen ambos NTs. Sin embargo, también existen terminales con un solo NT (Dumba, 2000; Lahjouji et al., 1996; Ornung et al., 1994, 1996; Taal y Holstege, 1994; Turman y Chandler, 1994; Wentzel et al., 1993). Recientemente se ha asociado la actividad glicinérgica con el control de la propagación episódica entre segmentos espinales contiguos, mientras que la actividad GABAérgica se ha relacionado con el control de redes locales formadas por interneuronas GABAérgicas y MNs (Hanson y Landmesser, 2003; Moody y Bosma, 2005).

Nuestros resultados muestran que únicamente el bloqueo de la inhibición GABAérgica provoca la contracción continua y descoordinada de los músculos de la pata trasera ipsilateral. En ninguno de los trabajos previamente descritos se ha asociado directamente la actividad de los circuitos GABAérgicos con el control de la actividad muscular. Los resultados obtenidos en esta tesis permiten correlacionar directamente la actividad GABAérgica de la medula espinal con el control y coordinación de los músculos, proponiendo al GABA como el principal NT involucrado en el control y activación de circuitos neuronales encargados de la actividad y coordinación muscular.

Por otro lado, el bloqueo de la transmisión Glicinérgica no tuvo un efecto en nuestras condiciones. Sin embargo, esto no quiere decir que la Gly no tenga una función en la médula espinal. La falta de efecto de la Stry en nuestros resultados podría explicarse, puesto que recientemente se ha reportado que la Gly está involucrada principalmente en el control de la actividad episódica entre segmentos espinales consecutivos (Hanson y Landmesser, 2003; Moody y Bosma, 2005). Por tal motivo, el efecto del bloqueo de la actividad glicinérgica no necesariamente sería visible a nivel del organismo (contracción muscular), sino que a nivel celular o de redes neuronales intramedulares podría tener un efecto muy notorio e importante.

Existencia de un umbral mínimo de MNs para la función motora

El número de MNs se ha correlacionado directamente con las deficiencias motoras observadas en diversos modelos de ELA (Corona y Tapia, 2004; Li et al., 2000; Ohta et al., 2008; Tovar-y-Romo et al., 2007). Actualmente en nuestro laboratorio se demostró que puede existir una pérdida de MNs (no mayor al 50%) sin llegar a generar deficiencias motrices, proponiendo un umbral mínimo de MNs espinales para realizar una actividad motora normal, evaluada en la prueba del rotarod (Santa Cruz, 2009).

En relación con lo anterior, únicamente el bloqueo crónico de la actividad GABAérgica provocó una disminución discreta de MNs, menor al 50%, la cual únicamente provocó la pérdida de la movilidad del dedo meñique ipsilateral, sin llegar a producir una parálisis total, ya que no encontramos cambios en las pruebas del Rotarod y del PGE. Estos resultados apoyan la existencia de un umbral mínimo de MNs del 50% necesario para producir una parálisis y una deficiencia motriz severa. Esto tiene una implicación clínica de gran importancia, puesto que en los casos clínicos de ELA, los pacientes son diagnosticados usualmente cuando ya presentan una deficiencia motriz severa, lo cual podría ser el reflejo de la pérdida de más del 50% de su población de MNs, de acuerdo con nuestras observaciones.

Conclusiones

Al igual que en la ELA y en el modelo crónico, la degeneración espinal inducida por la sobreactivación aguda del receptor AMPA, reproduce la pérdida de MNs acompañada de una astrogliosis.

La muerte de las primeras MNs (más del 50%) en etapas tempranas del modelo agudo (1.5-6 h) ocurre con las características histopatológicas de una necrosis rápida, mientras que de las MNs que se pierden durante las siguientes 24 h mueren mediante un proceso con características apoptóticas (aparición de la casp3a).

La aplicación crónica de AMPA causa la muerte de las MNs mediante un proceso semejante a una necrosis de lento progreso, en el cual se pueden identificar cuatro etapas degenerativas a nivel histológico en todas las MNs. Este proceso de muerte celular es acompañado por la aparición de la casp3a

En ambos modelos de sobreactivación del receptor AMPA, crónico y agudo, se presenta un incremento y activación de la astroglia, que puede favorecer el proceso degenerativo de las MNs, mediante la liberación de señales proapoptóticas que induzcan la activación de la vía extrínseca de la apoptosis en las MNs cercanas.

La pérdida de las MNs espinales induce la aparición de un tipo celular de menor tamaño que las MNs. Este tipo celular es semejante en morfología a macrófagos, los cuales están encargados de fagocitar y degradar los restos celulares, en este caso de las MNs.

La actividad GABAérgica de la región lumbar de la médula espinal se encuentra estrechamente relacionada con el control de la actividad de los circuitos neuronales motores, encargados de controlar y coordinar la contracción y relajación de los músculos de la extremidad inervada de esta región.

El estado de hiperexcitabilidad inducido por el bloqueo crónico de los circuitos GABAérgicos de la médula espinal, provoca una discreta pérdida de MNs que no sobrepasa el umbral mínimo de MNs

necesario para ejecutar correctamente la función motora, y por tanto, no genera un déficit motriz o parálisis en los organismos.

Los procesos de muerte de las MNs descritos en esta tesis para nuestros modelos, son semejantes a los descritos en ratones que desarrollan la ELA familiar, lo cual reafirma a nuestros sistemas como modelos experimentales de ELA, con la gran ventaja de no depender de factores genéticos y representar al 90 % de los casos de ELA, es decir a los del tipo esporádico.

Finalmente, hacemos énfasis en que conocer los procesos degenerativos implicados en la muerte de las MNs, brinda la posibilidad de generar estrategias que prevengan o atenúen la pérdida de MNs en la ELA. En esta tesis demostramos que la muerte de las MNs puede ocurrir a través de más de un solo proceso de muerte celular, lo cual es de gran importancia, ya que nos señala que posiblemente un tratamiento efectivo para la ELA pueda ser el resultado de prevenir diversos mecanismos de muerte celular. Asimismo, queda por probar si el bloqueo de la activación de las caspasas es capaz de prevenir la muerte de las MNs en ambos modelos.

Otro aspecto importante de esta tesis, es que retoma el estudio del papel de los circuitos inhibitorios y su posible relación con la muerte de las MNs, demostrando que el bloqueo crónico de la actividad GABAérgica es capaz de inducir la muerte de algunas MNs. Sin embargo, queda pendiente el estudio del posible efecto sinérgico del bloqueo de los circuitos inhibitorios en conjunto con la sobreactivación de los receptores AMPA, siendo que ambos eventos pueden ocurrir en la ELA humana.

Referencias

- 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.* 36: 846-858.
- Alexianu, M.E., Kozovska, M., Appel, S.H. (2001) Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurol.* 57:1282–1289.
- Alvarez, F.J. and Fyfee, E.W. (2007) The continuing case for the Renshaw cell. *J Physiol.* 584: 31-45.
- Araujo, I. M., Verdasca, M. J., Leal, E.C., Bahr, B. A., Ambrosio, A. F., Carvalho, A. P., Carvalho, C. M. (2004) Early calpain-mediated proteolysis following AMPA receptor activation compromises neuronal survival in cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 91:1322–1331.
- Arundine, M., and Tymianski, M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* 34: 325-337.
- Atkin, J.D., Farg, M.A., Turner, B.J., Tomas, D., Lysaght, J.A., Nunan, J., Rembach, A., Nagley, P., Beart, P.M., Cheema, S.S., Horne, M.K. (2006) Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J. Biol. Chem.* 281: 30152-30165.
- Baehrecke, E.H. (2002) How death shapes life during development. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3:779–787.
- Barkla, D.H., Gibson, P.R. (1999) The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology.* 31:230–238.
- Begg, A.A. and Jorgensen E.M. (2003) EXO-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nat. Neurosci.* 6: 1145-1152.
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., Gaiarsa, J.L., 1989. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol.* 416, 303–325.
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.L., Tyzio, R., Khazipov, R., 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 87, 1215–1284.
- Bendotti, C., Calvaresi, N., Chiveri, L., Prella, A., Moggio, M., Braga, M., Silani, V., De Biasi, S. (2001) Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. *J. Neurol. Sci.* 191:25-33.
- Beresford, P. J. et al. (2001) Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J. Biol. Chem.* 276:43285–43293.

- Bettler, B. and Mulle, C. (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34:123–139.
- Bi, X., Chen, J., Baudry, M. (1998) Calpain-mediated proteolysis of GluR1 subunits in organotypic hippocampal cultures following kainic acid treatment. *Brain Res.* 781:355–357.
- Bieger, D. (1991) Neuropharmacologic correlates of deglutition: lessons from fictive swallowing. *Dysphagia.* 6: 147-164.
- Bohlhalter, S., Mohler, H., Fritschy, J.M. (1994) Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: colocalization of glycine and GABA receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Res.* 642: 59–69.
- Boillée, S., Vande Velde, C., Cleveland, D.W. (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron.* 52: 39-59.
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., Cleveland, D.W., (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science.* 312:1389–1392.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., Wallach, D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 85:803–815.
- Bonnot, A., Corio, M., Tramu, G., and Viala, D. (1996) Immunocytochemical distribution of ionotropic glutamate receptor subunits in the spinal cord of the rabbit. *J. Chem. Neuroanat.* 11: 267–278.
- Brassat, D. (2010) Pathophysiology of multiple sclerosis. *Presse. Med.* 39: 341-8.
- Brissaud, O., Palin, K., Chateil, J. F., Pedespan, J.M. (2001) Multiple sclerosis: pathogenesis and manifestations in children. *Arch. Pediatr.* 8:969-78.
- Brodal, P. (1998) *The central nervous system (structure and function)*. Oxford University Press, Inc. Second edition. Chapter III.
- Brown, L. T., Jr. (1971) Projections and termination of the corticospinal tract in rodents. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung* 13, 432-450.
- Bruijn, L. I., Becher, M.W., Lee, M.K., Anderson, K.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Price, D.L., Cleveland, D.W. (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron.* 18: 327-338.
- Bruijn, L. I., Miller, T. M., Cleveland, D. W. (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:723-749.

- Burger, P.M., Hell, J., Mehl, E., Krasel, C., Lottspeich, F., Jahn, R. (1991) GABA and glycine in synaptic vesicles: Storage and transport characteristics. *Neuron* 7: 287–293.
- Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., Sakmann, B. (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited from a single subunit. *Neuron*. 8: 189-198.
- Carlton, S.M., and Hayes E.S. (1990) Light microscopic and ultrastructural analysis of GABA-immunoreactive profiles in the monkey spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 300: 162–182.
- Carunchio, I., Mollinari, C., Pieri, M., Merlo, D., Zona, C. (2008) GABAA receptors present higher affinity and modified subunit composition in spinal motor neurons from a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.* 28: 1275-1285.
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., Robinson, K.M., Mason, R.P., Beckman, J.S., Barbeito, L., Radi, R. (2008) Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J. Neurosci.* 28: 4115-4122.
- Cazalets, J. R., Borde, M., Clarac, F. (1996) The synaptic drive from the spinal locomotor network to motoneurons in the newborn rat. *J. Neurosci.* 16: 298-306.
- Celio, M.R. (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience.* 35: 375-475.
- Cereghetti, G.M., Scorrano, L. (2006) The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene.* 25:4717–4724.
- Chancellor, A. M., Warlow, C. P. (1992) Adult onset motor neuron disease: worldwide mortality, incidence and distribution since 1950. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 55: 1106-1115.
- Chandler, S. H., Nielsen, S. A., Goldberg L. J. (1985) The effects of glycine antagonist (strychnine) on cortically induced rhythical jaw movements in the anesthetized guinea pig. *Brain Res.* 325: 181-186.
- Chang, Q., Martin, L.J. (2009) Glycinergic innervation of motoneurons is deficient in amyotrophic lateral sclerosis mice: a quantitative confocal analysis. *Am. J. Pathol.* 174: 574-585.
- Chau, C., Giroux, N., Barbeau, H., Jordan, L., Rossignol, S. (2002) Effects of intrathecal glutamatergic drugs on locomotion I. NMDA in short-term spinal cats. *J. Neurophysiol.* 88:3032-3045.
- Chebib, M., Johnston, G. (1999) The ABC of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 937-940.
- Choi, C. and Benveniste, E.N. (2004) Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 44:65-81.

- Choi, D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Clark, M., Massenburg, G., Weiss, R. (1994) Post analysis of the hippocampal GABA_A receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine. *Mol. Brain. Res.* 26: 309-319.
- Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillee, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., Brown Jr., R.H., Julien, J.P., Goldstein, L.S., Cleveland, D.W. (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science.* 302: 113–117.
- Collingridge, G. L., and Lester, R. A. (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol.Rev.* 41: 143–210.
- Cookson, M.R. and Shaw, P.J. (1999) Oxidative stress and motor neurone disease. *Brain Pathol.*9: 165-186.
- Corona, J. C. and Tapia, R. (2004) AMPA receptor activation, but not the accumulation of endogenous extracellular glutamate, induces paralysis and motor neuron death in rat spinal cord in vivo. *J. Neurochem.* 89: 988-997.
- Corona, J. C. and Tapia, R. (2008) Calpain inhibition protects spinal motoneurons from the excitotoxic effects of AMPA in vivo. *Neurochem. Res.* 33:1428-1434.
- Corona, J.C., Tovar-y-Romo, L.B., Tapia, R. (2007) Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 11: 1415-1428.
- Corse, A.M., Bilak, M.M., Bilak, S.R., Lehar, M., Rothstein, J.D., Kuncl, R.W. (1999) Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. *Neurobiol. Dis.* 6: 335-346.
- Coyle, J. T. and Puffarcken, P. S. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science.* 262: 689-695.
- Cozzolino, M., Amori, I., Pesaresi, M.G., Ferri, A., Nencini, M., Carri, M.T. (2008) Cysteine 111 affects aggregation and cytotoxicity of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 283: 866-874.
- Curtis, D. R., Hosli, L., Johnston, G. A. (1967) Inhibition of spinal neurons by glycine. *Nature* 215: 1502-1503
- Curtis, D. R., Phillis, J. W., Watkins, J. C. (1959) Chemical excitation of spinal neurons. *Nature* 183:611-612.

- Davies, P.A., Wang W., Hales T. G., Kirkness E.F. (2003) A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn²⁺. *J. Biol. Chem.* 278: 712-717.
- De Blas, A. L. (1996) Brain GABAA receptors studied with subunitspecific antibodies. *Mol. Neurobiol.* 12: 55-71.
- Destombes, J., Horcholle-Bossavit, G., Simon, M., Thiesson, D. (1996) GABA-like immunoreactive terminals on lumbar motoneurons of the adult cat. A quantitative ultrastructural study. *Neurosci. Res.* 24: 123–130.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51: 7–61.
- Doble, A. (1996) The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology.* 47: S233-S241.
- Doble, A. and Martin, I. (1996) The GABAA/benzodiazepine receptor as a target for psychoactive drugs. In: *Neuroscience Intelligent Unit.* (Champan, Hill., eds). USA.
- Donato, R. and Nistri, A. (2001) Differential short-term changes in GABAergic or glycinergic synaptic efficacy on rat hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 86:565-574.
- Douglas, J. R., Noga, B. R., Dai, X., Jordan, L. M. (1993) The effects of intrathecal administration of excitatory amino acid agonists and antagonists on the initiation of locomotion in the adult cat. *J. Neurosci.* 13:990-1000.
- Dresbach, T., Nawrotzki, R., Kremer, T., Schumacher, S., Quinones, D., Kluska, M., Kuhse, J., Kirsch, J. (2008) Molecular architecture of glycinergic synapses. *Histochem. Cell. Biol.* 130: 617-633.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102:33–42.
- Dumba, J.S., Irish, P.S., Anderson, N.L., Westrum, L.E. (1998) Electron microscopic analysis of gamma-aminobutyric acid and glycine colocalization in rat trigeminal subnucleus caudalis. *Brain Res.* 806: 16-25
- Dumoulin, F.L., Raivich, G., Haas, C.A., Lazar, P., Reddington, M., Streit, W.J., Kreutzberg, G.W. (1992) Calcitonin gene-related peptide and peripheral nerve regeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 657:351–360.
- Dupuis, L., Gonzalez de Aguilar, J.L., Oudart, H., de Tapia, M., Barbeito, L., Loeffler, J.P. (2004) Mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis: a trigger and a target. *Neurodegener. Dis.* 1: 245-254.

- Elge, C. E., Speckmann, E. J., Caspers, H., et al. (1977) Cortico-spinal connections in the rat. I. Monosynaptic and polysynaptic responses of cervical motoneurons to epicortical stimulation. *Experimentelle Hirnforschung* 28, 385-404.
- Embacher, N., Kaufmann, W.A., Beer, R., Maier, H., Jellinger, K.A., Poewe, W., et al. (2001) Apoptosis signals in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: an immunocytochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl)* 102:426–434.
- Enomoto, S., Katakura, N., Sunada, T., KAtayama, T., Hirose, Y., Ishiwata, Y., Nakamura, Y. (1987) Cortically induced masticatory rhythm in masseter motoneurons after blocking inhibition by strychnine and tetanus toxin. *Neurosci. Res.* 4: 396-412.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D., Lieberman, J. (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell.* 112:659–672.
- Feeney, S.J., McKelvie, P.A., Austin, L., Jean-Francois, M.J., Kapsa, R., Tombs, S.M., Byrne, E. (2001) Presymptomatic motor neuron loss and reactive astrogliosis in the SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 24:1510–1519.
- Feske, S.K. and Cochrane, T.I. (2007) Degenerative and compressive structural disorders. In: Goetz CG, ed. *Textbook of Clinical Neurology*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier. Chap 29.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. (2006) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757:1371–1387.
- Foster, A.C. and Kemp J.A. (2006) Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 6: 7-17.
- Furuyama, T., Kiyama, H., Sato, K., Park, H. T., Maeno, H., Takagi, H., and Tohyama, M. (1993) Region-specific expression of subunits of ionotropic glutamate receptors (AMPA-type, KA-type and NMDA receptors) in the rat spinal cord with special reference to nociception. *Brain Res.* 18: 141–151.
- Gao, B. X., Stricker, C., Ziskind-Conhaim, L. (2001) Transition from GABAergic to glycinergic synaptic transmission in newly formed spinal networks. *J. Neurophysiol.* 86: 492-502.
- Gao, B. X. and Ziskind-Conhaim, L. (1995). Development of glycine- and GABA-gated currents in rat spinal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 74: 119-121.

- Geiman, J; Zheng, W., Fritschy, J.M., Alvarez, F.J. (2002) Glycine and GABAA receptor subunits on Renshaw cells: Relationship with presynaptic neurotransmitters and postsynaptic gephyrin clusters. *J. Comp. Neurol.* 444: 275-289.
- Golstein, P. and Kroemer, G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends. Biochem. Sci.* 32:37-43.
- González-Forero, D. and Alvarez, F.J. (2005) Differential postnatal maturation of GABAA, glycine receptor, and mixed synaptic currents in Renshaw cells and ventral spinal interneurons. *J. Neurosci.* 25: 2010-2023.
- Goulding, M., Lanuza, G., Sapir, T., Narayan, S. (2002) The formation of sensorimotor circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12: 508-515.
- Graber, D.J., Hickey, W.F., Harris, B.T. (2010) Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation.* 28:7-8.
- Gurney, M.E. (2000) What transgenic mice tell us about neurodegenerative disease. *Bioessays.* 22: 297-304.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L., Siddique, T. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 264: 1772-1775.
- Guttmann, R.P., Sokol, S., Baker, D. L., Simpkins, K. L., Dong, Y., Lynch, D. R. (2002) Proteolysis of the N-methyl-D-aspartate receptor by calpain in situ. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:1023-1030.
- Guyton, A.C. (1994) Anatomía y fisiología del sistema nervioso (Neurociencia básica). Médica Panamericana. Segunda edición. Capítulo I y II.
- Hägglund, M., Borgius, L., Dougherty, K. J., Kiehn, O. (2010) Activation of groups of excitatory neurons in the mammalian spinal cord or hindbrain evokes locomotion. *Nat Neurosci.* 13: 246-52.
- Hall, E.D., Oostveen, J.A., Gurney, M.E. (1998) Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia.* 23:249-256.
- Hanson, M.G., Landmesser, L.T. (2003) Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in early embryonic mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 15: 587-600.

- Harratz, M.M., Marden, J.J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V.S., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Schoneich, C., Engelhardt, J.F. (2008) SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J. Clin. Invest.* 118: 659-670.
- Hayashi, T. (1952) A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn. Physiol.* 3:46-64.
- Hayashi, T. (1958) Inhibition and excitation due to gamma-aminobutyric acid in the central nervous system. *Nature.* 182:1076-1077.
- Hegde, R. et al. (2002) Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* 277:432-438.
- Hervias, I., Beal, M.F., Manfredi, G. (2006) Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 33: 598-608.
- Hevers, W. and Luddens, H. (1998) The diversity of GABAA receptors. *Mol Neurobiol* 18: 35-86.
- Hochman, S., Jordan, L. M., Schmidt, B. J. (1994) TTX- resistant NMDA-receptor-mediated voltage oscillations in mammalian lumbar motoneurons. *J. Neurophysiol.* 72: 2559-2562.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., et al. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1:489-495.
- Hollmann, M., Hartley, M., Heinemann, S. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 252: 851-853.
- Holstege, J. C. and Calkoen, F. (1990) The distribution of GABA in lumbar motoneuronal cell groups. A quantitative ultrastructural study in rat. *Brain Res.* 530: 130-137.
- Hori, N., Carp, J. S., Carpenter, D. O., Akaike, N. (2002) Corticospinal transmission to motoneurons in cervical spinal cord slices from adult rats. *Life Sci.* 72:389-396.
- Hume R. I., Dingledine, R., Heinemann, S. F. (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science.* 253: 1028-1031.
- Ince, P., Stout, N., Shaw, P., Slade, J., Hunziker, W., Heizmann, C.W., Baimbridge, K.G. (1933) Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 19: 291-299.
- Inoue, T., Chandler, S. H., Goldberg, L. J. (1994) Neuropharmacological mechanisms underlying rhythmical discharge in trigeminal interneurons during fictive mastication. *J. Neurophysiol.* 71: 2061-2073.

- Itzecka, J. (2007) Decreased cerebrospinal fluid cytochrome c levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 67: 264-269.
- Jiang, M., Schuster, J.E., Fu, R., Siddique, T., Heckman, C.J. (2009) Progressive changes in synaptic inputs to motoneurons in adult sacral spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* 29:15031-15038.
- Jiang, M.C. and Heckman, C.J. (2006) In vitro sacral cord preparation and motoneuron recording from adult mice. *J. Neurosci. Methods.* 156:31-36.
- Jiang, X. et al. (2003) Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin- α in a death regulatory pathway. *Science.* 299:223–226.
- Jonas, P., Bischofberger, J., Sandkuhler, J. (1998) Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science.* 281: 419-424.
- Jordan, J., Cena, V., Prehn, J.H. (2003) Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J. Physiol. Biochem.* 59:129–41.
- Jordan, L. M., Liu, J., Hedlund, P. B., Akay, T., Pearson, K. G. (2008) Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Res Rev.* 57:183-91.
- Julien, J. P. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell.* 104: 581-591.
- Kalai, M., Van Loo, G., Vanden Berghe, T., Meeus, A., Burm, W., Saelens, X., et al. (2002) Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell Death Differ.* 9:981–994.
- Kardos, J. (1999) Recent advances in GABA research. *Neurochem Int* 34: 353-358.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26:239–257.
- Kieran, D., Woods, I., Villunger, A., Strasser, A., Prehn, J.H. (2007) Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 20606-20611.
- Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guegan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, A.A., McKhann, G.M. 2nd, Przedborski, S. (2006) Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 6025-6030.
- Kirsch J., Kuhse J., Betz H. (1995) Targeting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 6:450–461.

- Kjaerulff, O. and Kiehn, O. (1997) Crossed rhythmic synaptic input to motoneurons during selective activation of the contralateral spinal locomotor network. *J. Neurosci.* 17: 9433-9447.
- Kostuik J. P., Harrington, I., Alexander, D., Rand, W., Evans, D. (1986) Cauda equina syndrome and lumbar disc herniation. *J. Bone. Joint Surg. Am.* 68: 386-391.
- Krebs, H.A., Eggleston, L.V., Hems, R. (1949) Distribution of glutamine and glutamic acid in animal tissues. *Biochem. J.* 44:159-63.
- Kriz, J., Nguyen, M.D., Julien, J.P. (2002) Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 10:268–278.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G.; Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16:3-11.
- Kushner, P.D., Stephenson, D.T., Wright, S. (1991) Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50:263–277.
- Lahjouji, F. Barbe, A., Chanzal, G., Bras, H. (1996) Evidence for colocalization of GABA and glycine in afferents to retrogradely labeled rat abducens motoneurons. *Neurosci. Lett.* 206: 161-164.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., Lazebnik, Y. (2002) Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science.* 297:1352–1354.
- Lazar, P., Reddington, M., Streit, W., Raivich, G., Kreutzberg, G.W. (1991) The action of calcitonin gene-related peptide on astrocyte morphology and cyclic AMP accumulation in astrocyte cultures from neonatal rat brain. *Neurosci. Lett.* 130:99–102.
- Legendre, P. (2001). The glycinergic inhibitory synapse. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 760-793.
- Lende, R. A. (1963) Cerebral cortex: a sensorimotor amalgam in the marsupial. *Science (New York, N. Y.)* 141: 730-732.
- Lepore, A.C., Dejea, C., Carmen, J., Rauck, B., Kerr, D.A., Sofroniew, M.V., Maragakis, N.J. (2008) Selective ablation of proliferating astrocytes does not affect disease outcome in either acute or chronic models of motor neuron degeneration. *Exp. Neurol.* 211:423-32.
- Li, L. Y., Luo, X., Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 412:95–99.

- Li, M., Ona, V.O., Guégan, C., Chen, M., Jackson-Lewis, V., Andrews, L.J., Olszewski, A.J., Stieg, P.E., Lee, J.P., Przedborski, S., Friedlander, R.M. (2000) Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science*. 288:335-339.
- Li, P. et al. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91:479–489.
- Lim, R., Alvarez, F. J., Walmsley, B. (2000) GABA mediates presynaptic inhibition at glycinergic synapses in a rat auditory brainstem nucleus. *J. Physiol*. 525: 447-459.
- Lipton, S. A. and Rosenberg, P. A. (1994) Excitatory aminoacids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med*. 330: 613-622.
- Locatelli, F., Corti, S., Papadimitriou, D., Fortunato, F., Del Bo, R., Donadoni, C., Nizzardo, M., Nardini, M., Salani, S., Ghezzi, S., Strazzer, S., Bresolin, N., Comi, G.P. (2007) Fas small interfering RNA reduces motoneuron death in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Ann. Neurol*. 62: 81-92.
- Lorenzo, L.E., Barbe, A., Portalier, P., Fritschy, J.M., Bras, H. (2006) Differential expression of GABAA and glycine receptors in ALS-resistant vs. ALS-vulnerable motoneurons: possible implications for selective vulnerability of motoneurons. *Eur J Neurosci*. 23: 3161-3170.
- Louvel, E., Hugon, J., Doble, A. (1997) Therapeutic advances in amyotrophic lateral sclerosis. *TiPS*. 18:196-203.
- Lucas, D. R. and Neuhouse, J. P. (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol*. 58:193-201.
- Lynch, J.W. (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor Chloride channel. *Physiol. Rev*. 84: 1051-1095.
- Lynch, J.W. (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 56: 303-309.
- Ma, B., Wu, H., Jia, L. S., Yuan, W., Shi, G. D., Shi, J. G. (2009) Cauda equine syndrome: a review of clinical progress. *Chin. Med. J. (Engl)*. 122: 1214-1222.
- Macdonald, R. L. and Olsen, R. W. (1994) GABAA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci*. 17: 569-602.
- Magoul, R., Onteniente, B., Geffard, M., Calas, A. (1987) Anatomical distribution and ultrastructural organization of the GABAergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibodies. *Neuroscience*. 20: 1001–1009.
- Maragakis, N.J. and Rothstein, J.D. (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol. Dis*. 15, 461–473.

- Maragakis, N.J. and Rothstein, J.D., (2006) Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 679–689.
- Marden, J.J., Harraz, M.M., Williams, A.J., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Engelhardt, J.F. (2007) Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117: 2913-2919.
- Martin, D., Thompson, M. A., Nadler, J. V. (1993) The neuroprotective agent riluzole inhibits release of glutamate and aspartate from slices of hippocampal area CA1. *Eur. J. Pharmacol.* 250: 473-476.
- Martin, L. J. (1999) Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58:459–71.
- Martin, L. J. and Lui, Z. (2004) Opportunities for neuroprotection in ALS using cell death mechanism rationales. *Drug Discov.* 1:135:143.
- Martin, L. J., Al-Abdulla, N. A., Brambrink, A.M., Kirsch, J.R., Sieber, F.E., Portera-Cailliau, C. (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.* 46:281-309.
- Martin, L. J., Chen, K., Liu, Z. (2005) Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation. *J. Neurosci.* 25:6449–6459.
- Martin, L. J., Gertz, B., Pan, Y., Price, A. C., Molkentin, J.D., Chang, Q. (2009) The mitochondrial permeability transition pore in motor neurons: involvement in the pathobiology of ALS mice. *Exp. Neurol.* 18:333-46.
- Martin, L. J., Liu, Z., Chen, K., Price, A.C., Pan, Y., Swaby, J.A., Golden, W.C. (2007) Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J. Comp. Neurol.* 500:20-46.
- Matsumoto, A., Y. Okada, et al. (2006). "Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats." *J. Neurosci. Res.* 83: 119-133.
- McCord J. M., Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049–6055.
- McLaughlin, B.J., Barber, R., Saito, K., Roberts, E., Wu, J.Y. (1975) Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 164: 305–321.
- Meier, E., Hertz, L., Schousboe, A. (1991) Neurotransmitters as neurochemical signals. *Neurochem. Int.* 19: 1-15.
- Meldrum, B. S. (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130: S1007-S1015.

- Melino, G. (2001) The Sirens' song. *Nature*. 412:423.
- Mentis, G.Z., Alvarez, F.J., Bonnot, A., Richards, D.S., Gonzalez-Forero, D., Zerda, R., O'Donovan, M.J. (2005) Noncholinergic excitatory actions of motoneurons in the neonatal mammalian spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 7344–7349.
- Merrill, E. G. and Fedorko, L. (1984) Monosynaptic inhibition of phrenic motoneurons: a long descending projections from Botzinger neurons. *J. Neurosci.* 4: 2350-2353.
- Michaelis, E. K. (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54: 369–415.
- Monaghan, D. T., Bridges, R. J., Cotman, C. W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 365–402.
- Moody, W.J. and Bosma, M.M. (2005) Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol. Rev.* 85: 883–941.
- Mugnaini, E. and Oertel, W.H. (1985) An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy. GABA and Neuropeptides in the CNS. Part I*, edited by A. Bjorklund and T. Hokfelt. New York: Elsevier:436–608.
- Mulder, D.W., Kurland, L.T., Offord, K.P., Beard, C.M. (1986) Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 36: 511-517.
- Muller, E., Le-Corronc, H., Legendre, P. (2008) Extrasynaptic and postsynaptic receptors in glycinergic and GABAergic neurotransmission: a division of labor? *Front. Mol. Neurosci.* 1: 1-10.
- Murphy, S.M., Pilowsky, P.M., Llewellyn-Smith (1996) Vesicle shape and amino acids in synaptic inputs to phrenic motoneurons: do all inputs contain either glutamate or GABA? *J.Comp. Neurol.* 373: 200–219.
- Muzio, M. et al. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 85:817–827.
- Nagai, M., M. Aoki, et al. (2001) Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.* 21: 9246-9254.
- Nagy, D., Kato, T., Kushner, P.D., (1994) Reactive astrocytes are widespread in the cortical gray matter of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 38:336–347.

- Nakagawa, T. and Yuan, J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* 150:887–894.
- Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597–603.
- Nicotera, P., Bernassola, F., Melino, G. (1999) Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death Differ.* 6:931–933.
- Nicotera, P. and Melino, G. (2004) Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene.* 23:2757–2765.
- Nishimaru, H., Restrepo, C.E., Ryge, J., Yanagawa, Y., Kiehn, O. (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 5245–5249.
- Nishitoh, H., Kadowaki, H., Nagai, A., Maruyama, T., Yokota, T., Fukutomi, H., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., Ichijo, H. (2008) ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.* 22: 1451-1464.
- Northington, F.J, Ferriero, D.M., Flock, D.L., Martin, L.J. (2001) Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.* 21:1931-1938.
- Nudo, R.J. and Masterton, R. B. (1990 a) Descending pathways to the spinal cord, III: Sites of origin of the corticospinal tract. *J. Comp. Neurol.* 296:559-583.
- Nudo, R.J. and Masterton, R. B. (1990 b) Descending pathways to the spinal cord, IV: Some factors related to the amount of cortex devoted to the corticospinal tract. *J. Comp. Neurol.* 296:584-597.
- Obrietan, K., van den Pol, A.N., 1995. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing. *J. Neurosci.* 15:5065–5077.
- Ohka, S. (2009) Analysis of dissemination pathways for poliovirus. *Uirusu.* 59: 107-14
- Ohta, Y., Kamiya, T., Nagai, M., Nagata, T., Morimoto, N., Miyazaki, K., Murakami, T., Kurata, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Asoh, S., Ohta, S., Abe, K. (2008) Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Res.* 86:3028-3037.
- Olanow, C. W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* 16:439-444.
- Oleskevich, S., Alvarez, F.J., Walmsley, B. (1999) Glycinergic miniature synaptic currents and receptor cluster sizes differ between spinal cord interneurons. *J. Neurophysiol.* 82: 312–319.

- Onley, J. W. (1969) Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 164:719-721.
- Onley, J. W. and Ho, O. L. (1970) Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature*. 227:609-611.
- Onley, J. W., Sharpe, L. G., Feigin, R. D. (1972) Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 31:464-488.
- Orendáčová, J., Cízková, D., Kafka, J., Lukáčová, N., Marsala, M., Sulla, I., Marsala, J., Katsube, N. (2001) Cauda equina syndrome. *Prog. Neurobiol.* 64: 613-637.
- Örnung, G., Ottersen, O., Cullheim, S., Ulfhake, B. (1998) Distribution of glutamate-, glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on dendrites in the cat spinal motor nucleus. *Exp. Brain Res.* 118: 517–532.
- Ornung, G., Shupliakov, O., Linda, H., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., Ulfhake, B., Cullheim, S. (1996) Qualitative and quantitative analysis of glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on motoneuron cell bodies in the cat spinal cord: A postembedding electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 365: 413– 426.
- Ornung, G., Shupliakov, O., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., Cullheim, S. (1994) Immunohistochemical evidence for coexistence of glycine and GABA in nerve terminals on cat spinal motoneurons: An ultrastructural study. *Neuroreport*. 5: 889–892.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:552-565.
- Palecek, J., Lips, M.B., Keller, B.U. (1999) Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J. Physiol.* 520 (Pt2): 485-502.
- Parkis, M. A., Dong, X.-W., Feldman, J. L., Funk, G. D. (1999) Concurrent inhibition and excitation of phrenic motoneurons during inspiration: phase-specific control of excitability. *J. Neurosci.* 19: 2368-2380.
- Pasinelli, P., Houseweart, M.K., Brown, R.H. Jr, Cleveland, D.W. (2000) Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:13901-13906.
- Perret, C. (1983) Centrally generated pattern of motoneuron activity during locomotion in cat. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27: 405-422.

- Petras, J. M. (1969) Some efferent connections of the motor and somatosensory cortex of simian primates and felis, canid and procyonoid carnivores. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 167:469-505.
- Petri, S., Kollewe, K., Grothe, C., Hori, A., Dengler, R., Bufler, J., Krampfl, K. (2006) GABA(A)-receptor mRNA expression in the prefrontal and temporal cortex of ALS patients. *J. Neurol. Sci.* 250:124-132.
- Phukan, J., Pender, N.P., Hardiman, O. (2007) Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol.* 6: 994-1003.
- Prior P, Schmitt B, Grenningloh G, Pribilla I, Multhaup G, Beyreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J et al (1992) Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8:1161–1170.
- Ramirez-Leon, V. and Ulfhake, B. (1993) GABA-like immunoreactive innervation and dendro-dendritic contacts in the ventrolateral dendritic bundle in the cat S1 spinal cord segment: an electron microscopic study. *Exp. Brain Res.* 97: 1–12.
- Ray, S. K. and Banik, N. L. (2003) Calpain and its involvement in the pathophysiology of CNS injuries and diseases: therapeutic potential of calpain inhibitors for prevention of neurodegeneration. *Curr. Drug Targets C.N.S. Neurol. Disord.* 2:173–189.
- Reddington, M., Priller, J., Treichel, J., Haas, C., Kreutzberg, G.W. (1995) Astrocytes and microglia as potential targets for calcitonin gene related peptide in the central nervous system. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73:1047–1049.
- Reichling, D.B., Kyrozis, A., Wang, J., MacDermott, A.B., 1994. Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *J. Physiol.* 476, 411–421.
- Rekling, J. C., Funk, G. D., Bayliss, D. A., Dong, X. W., Feldman, J. L. (2000) Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol. Rev.* 80: 767-852.
- Renshaw, B. (1946) Central effects of centripetal impulses in axons of spinal ventral roots. *J. Neurophysiol.* 9: 191–204.
- Ringer, C., Weihe, E., Schütz, B. (2009) Pre-symptomatic alterations in subcellular betaCGRP distribution in motor neurons precede astrogliosis in ALS mice. *Neurobiol. Dis.* 35:286-295.
- Rizzardini, M., Mangolini, A., Lupi, M., Ubezio, P., Bendotti, C., Cantoni, L. (2005) Low levels of ALS-linked Cu/Zn superoxide dismutase increase the production of reactive oxygen species and cause mitochondrial damage and death in motor neuron-like cells. *J. Neurol. Sci.* 232: 95-103.

- Roach, H.I. and Clarke, N.M. (2000) Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* 82:601–613.
- Robertson, G. A. and Stein, P. S. (1988) Synaptic control of hindlimb motoneurons during three forms of the fictive scratch reflex in the turtle. *J. Physiol. (Lond)* 404: 101-128.
- Robertson, J. D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B., Orrenius, S. (2002) Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:29803–29809.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362: 59-62.
- Rossi, D., Brambilla, L., Valori, C.F., Roncoroni, C., Crugnola, A., Yokota, T., Bredesen, D.E., Volterra, A. (2008) Focal degeneration of astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Differ.* 15:1691-1700.
- Rothstein, J. D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Kuncl, R.W. (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6591-6595.
- Rothstein, J. D., Martin, L.J., Kuncl, R. W. (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 326: 1464-1468.
- Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncl, R. W. (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38: 73-84.
- Rowland, L. P. and Shneider, N. A. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Eng. L. J. Med* (2001) 344:1688-1700.
- Sanagi T, Yuasa S, Nakamura Y, Suzuki E, Aoki M, Warita H, Itoyama Y, Uchino S, Kohsaka S, Ohsawa K. (2010) Appearance of phagocytic microglia adjacent to motoneurons in spinal cord tissue from a presymptomatic transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci Res.* 88:2736-2746.
- Santa Cruz de Alba, L. (2009) Efecto de sustratos energéticos sobre la degeneración de motoneuronas espinales in vivo (Tesis de Maestría-Universidad Nacional Autónoma de México).
- Sargsyan, S.A., Monk, P.N., Shaw, P.J. (2005) Microglia as potential contributors to motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia.* 51:241–253.

- Sasaki, S., Warita, H., Abe, K., Iwata, M. (2005) Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol.* 110: 48-56.
- Schiffer, D. and Fiano, V. (2004). Astrogliosis in ALS: possible interpretations according to pathogenetic hypotheses. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 5:22–25.
- Schiffer, D., Cordera, S., Cavalla, P., Migheli, A. (1996) Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 139:27–33 Suppl.
- Schmitt, B., Knaus, P., Becker, C.M., Betz, H. (1987) The Mr 93, 000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein. *Biochem.* 26:805–811.
- Schoepfer, R., Monyer, H., Sommer, B., Wisden, W., Sprengel, R., Kuner, T., Lomeli, H., Herb, A., Kohler, M., Burnashev, N. (1994) Molecular biology of glutamate receptors. *Prog. Neurobiol.* 42: 353–357.
- Scott, P.J. (1965) Bladder paralysis in cauda equina lesions from disc prolapse. *J. Bone. Joint. Surg. Br.* 47: 224-235.
- Seeburg, P. H. (1993a) The TINS/TIPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16: 359–365.
- Seeburg, P. H. (1993b) The TIPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 297–303, 1993.
- Shaw, P. J. (2005) Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 76: 1046-1057.
- Shupliakov, O., Ornung, G., Brodin, L., Ulfhake, B., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J., Cullheim, S. (1993) Immunocytochemical localization of amino acid neurotransmitter candidates in the ventral horn of the cat spinal cord: a light microscopic study. *Exp. Brain Res.* 96: 404–418.
- Sibilla, S. and Ballerini, L. (2009) GABAergic and glycinergic interneuron expression during spinal cord development: dynamic interplay between inhibition and excitation in the control of ventral network outputs. *Prog. Neurobiol.* 89: 46-60.
- Sieghart, W., Fuchs, K., Tretter, V., Ebert, V., Jechlinger, M., Hoyer, H., Adamiker, D. (1999) Structure and subunit composition of GABA_A receptors. *Neurochem Int* 34: 379-385.
- Siklós, L., Engelhardt, J. I., Alexianu, M. E., Gurney, M. E., Siddique, T., Appel, S.H. (1998) Intracellular calcium parallels motoneuron degeneration in SOD-1 mutant mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57:571-587.

- Singer, J.H. and Berger, A.J. (2000) Development of inhibitory synaptic transmission to motoneurons. *Brain Res. Bull.* 53: 553-60.
- Smith, S.S., Gong, Q., Li, X., Moran, M., Bitran, D., Frye, C., Hsu, F. (1998) Withdrawal from 3 α -OH-5 α -pregnan-20-one using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABAA-gated current and increases the GABAA receptor α 4 subunit its association with increased anxiety. *J. Neurosci.* 18: 5275-5284.
- Sofroniew, M.V. (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 11:400–407.
- Sperandio, S., de Belle, I., Bredesen, D.E. (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:14376–14381.
- Sperandio, S., Poksay, K., de Belle, I., Lafuente, M. J., Liu, B., Nasir, J., et al. (2004) Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell. Death. Differ.* 11:1066–1075.
- Srinivasula, S. M. et al. (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature.* 410:112–116.
- Sur, C., McKernan, R., Triller, A. (1995) Subcellular localization of the GABAA receptor gamma 2 subunit in the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1323–1332.
- Susin, S. A. et al. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184:1331–1341.
- Taal, W. and Holstege, J.C. (1994) GABA and glycine frequently colocalize in terminals on cat spinal motoneurons. *Neuroreport.* 5: 2225–2228.
- Tapia, R. (1998) Mecanismos celulares y moleculares de la neurodegeneración. *Gac. Med. Mex.* 134:685-703.
- Tapia, R., Medina-Ceja, L., Peña, F. (1999) On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem. Int.* 34:23-31.
- Todd, A.J., Watt, C., Spike, R.C., Sieghart, W. (1996) Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 16: 974–982.
- Tolle, T. R., Berthele, A., Zieglansberger, W., Seeburg, P. H., Wisden, W. (1993) The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J. Neurosci.* 13: 5009–5028.
- Tolosa, L., Mir, M., Asensio, V.J., Olmos, G., Llado, J. (2008) Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Neurochem.* 105: 1080-1090.

- Tovar-y-Romo, L.B. and Tapia, R. (2006) Cerebral neurons of transgenic ALS mice are vulnerable to glutamate release stimulation but not to increased extracellular glutamate due to transport blockade. *Exp. Neurol.* 199: 281-290.
- Tovar-Y-Romo L. B. and Tapia, R. (2010) VEGF protects spinal motor neurons against chronic excitotoxic degeneration in vivo by activation of PI3-K pathway and inhibition of p38MAPK. *J Neurochem.* (En prensa).
- Tovar-y-Romo, L.B., Zepeda, A., Tapia, R. (2007) Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66: 913-922.
- Tretter, V., Jacob, T.C., Mukherjee, J., Fritschy, J.M., Pangalos, M.N., Moss, S.J. (2008) The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci.* 28:1356–1365
- Triller, A., Cluzaud, F., Korn, H. (1987) Gamma-Aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses. *J. Cell Biol.* 104: 947–956.
- Turman, J.J. and Chandler, S.H. (1994) Immunohistochemical evidence for GABA and glycine-containing trigeminal premotoneurons in the guinea pig. *Synapse* 18: 7–20.
- Waterhouse, N. J. et al. (1998) Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 5:1051–1061.
- Watson, C. and Harvey, A (2009) Projections from the brain to the spinal cord, in *The spinal cord* (Watson, C., Paxinos, G. and Kayalioglu, G., eds), pp 168-179. Academic Press, Sydney.
- Watson, C., Paxinos, G., Kayalioglu, G. (2009) *The spinal cord*. Christopher and Dana Reeve Foundation. Primera edición.
- Wentzel, P.R., De Zeeuw, C.I., Holstege, J.C., Gerrits, N.M. (1993) Colocalization of GABA and glycine in the rabbit oculomotor nucleus. *Neurosci. Lett.* 164: 25–29.
- Werman, R., Davidoff, R.A., Aprison, M.H. (1967) Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. *Nature* 214, 681–683
- Withington-Wray, D. J., Mifflin, S. W., Spyer, K. M. (1988) Intracellular analysis of respiratory-modulated hypoglossal motoneurons in the cat. *Neuroscience.* 25: 1041-1051.
- Woch, G. and Kubin, L. (1995) Non-reciprocal control of rhythmic activity in respiratory-modulated XII motoneurons. *Neuroreport.* 6: 2085-2088.
- Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., Price, D.L. (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation

causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*. 14: 1105-1116.

Wood, J.D., Beaujeux, T.P., Shaw, P.J. (2003) Protein aggregation in motor neurone disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29: 529-545.

Yamazaki. M., Esumi, E., Nakano, I. (2005) Is motorneuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis? *Neuropathology*. 25:381–387.

Zagoraïou, L., Akay, T., Martin, J. F., Brownstone, R. M., Jessell, T. M., Miles, G. B. (2009) A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron*. 64: 645-662.