



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

**MECANISMOS DE LA SELECTIVA
VULNERABILIDAD DE LAS MOTONEURONAS
ESPINALES A LA EXCITOTOXICIDAD MEDIADA
POR LOS RECEPTORES AMPA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M EN C. JUAN CARLOS CORONA CASTILLO

LABORATORIO: DR. RICARDO TAPIA IBARGÜENGOYTIA

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2007



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.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de abril del 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno **JUAN CARLOS CORONA CASTILLO** con número de cuenta **501048563** con la tesis titulada: "**Mecanismos de la selectiva vulnerabilidad de las motoneuronas espinales a la excitotoxicidad mediada por los receptores AMPA**", bajo la dirección del **Dr. Ricardo Tapia Iburgüengoytia**.

Presidente:	Dra. Lourdes Massieu Trigo
Vocal:	Dra. Clorinda Arias Álvarez
Vocal:	Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Vocal:	Dr. Juan Fernández Ruiz
Secretario:	Dr. Ricardo Tapia Iburgüengoytia
Suplente:	Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Suplente:	Dr. Edmundo Chávez Cosío

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de julio del 2007.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. RICARDO TAPIA.

CON EL APOYO DE LA BECA DEL CONACYT (167209) Y LA BECA COMPLEMENTARIA DE LA DGEP.

COMITÉ TUTORAL:

DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

Miembros del Jurado

Dra. Lourdes Massieu Trigo
Dra. Clorinda Arias Álvarez
Dr. Julio Morán Andrade
Dr. Juan Fernández Ruiz
Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Dr. Edmundo Chávez Cosío
Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia

DEDICATORIAS

A MI MADRE CARMEN CASTILLO, POR TODO SU AMOR Y POR ESAS FUERZAS DE VIVIR LA VIDA. ¡GRACIAS POR TODO MA!

A TI DELY POR TODO TU AMOR, POR EL TIEMPO QUE HE PASADO CONTIGO EN LA LUCHA DE SEGUIR SIEMPRE ADELANTE Y POR EL MARAVILLOSO SER HUMANO QUE ERES.

A ANGEL CORONA IN MEMORIAM

A MIS HERMANOS, GUSTAVO, EMILIO, ISABEL, CÉSAR, POR TODO SU CARÍÑO, AMOR Y APOYO.

“LA CIENCIA TIENE COMO META: EL MENOR DOLOR POSIBLE, UNA VIDA LO MÁS LARGA POSIBLE....., POR CONSIGUIENTE, UNA ESPECIE DE FELICIDAD ETERNA, CIERTAMENTE MUY MODESTA EN COMPARACIÓN CON LAS PROMESAS DE LAS RELIGIONES”

FEDERICO NIETZSCHE.

AGRADECIMIENTOS

AL DR. RICARDO TAPIA POR ENSEÑARME EL SER Y HACER DE LA CIENCIA, POR TODOS SUS CONSEJOS Y ENSEÑANZAS, LOS CUALES HAN SIDO INVALUABLES EN MIS CONOCIMIENTOS.

A LOS MIEMBROS DE MI COMITÉ TUTORAL: DRA. CLORINDA ARIAS Y DR. FEDERICO BERMÚDEZ. POR SUS CONSEJOS Y ORIENTACIONES DURANTE TODO ESTE TIEMPO.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR SUS SUGERENCIAS Y COMENTARIOS.

ESPECIALMENTE A MAYRA Y JACQUELINE, QUE HAN SIDO COMO MIS HERMANAS PEQUEÑAS, ESPERO QUE CONTINÚEN Y LES APASIONE TANTO COMO A MÍ EL MARAVILLOSO MUNDO DE LA CIENCIA. A TODOS MIS CUÑADOS Y SOBRINOS.

A TODOS LOS QUE ESTÁN Y ESTUVIERON EN EL LABORATORIO: GABY VERA, XOCHITL, MARINA, PATY, LUÍS, MIGUEL, FERNANDO, IVÁN, Y LOS QUE ME FALTEN...POR TODO EL TIEMPO QUE COMPARTIMOS JUNTOS, POR LAS BUENAS PLATICAS Y ESOS MOMENTOS AGRADABLES.

A MIS ALUMNITOS CON MUCHO CARIÑO: MARIANA RAMOS, GABRIELA MICHEL, OSCAR BUSTAMANTE Y DIANA SANTA CRUZ.

A MIS AMIGOS DE PUEBLA: JUAN CARLOS (EL COCO), RICARDO, SANDRA Y LOS QUE FALTEN.....POR LOS GRANDES MOMENTOS QUE HEMOS PASADO JUNTOS.

A LA BANDA DEL INSTITUTO Y ANEXOS; ALBERTO, OCTAVIO (MANOS), PHILIP, ÍLSE, JAVIER, POR TODOS ESAS JARRAS, VIAJES (DE LOS DOS), GRANDES PLATICAS Y EXPERIENCIAS QUE PASAMOS JUNTOS.

IGUALMENTE A MIS VECINAS DEL LABORATORIO DE AL LADO.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
EXCITOTOXICIDAD Y NEURODEGENERACIÓN.....	6
EL CALCIO Y LA MUERTE NEURONAL.....	7
LAS CALPAÍNAS.....	7
REGULACIÓN DE CALCIO POR LA MITOCONDRIA.....	8
ARTÍCULO 1: MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN.....	10
II. ANTECEDENTES.....	11
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.....	11
ALS FAMILIAR.....	12
HIPÓTESIS DE LOS MECANISMOS DE LA ALS ESPORÁDICA.....	14
VULNERABILIDAD SELECTIVA DE LAS MOTONEURONAS.....	14
ARTÍCULO 2: AMPA RECEPTOR ACTIVATION, BUT NOT THE ACCUMULATION OF ENDOGENOUS EXTRACELLULAR GLUTAMATE, INDUCES PARALYSIS AND MOTOR NEURON DEATH IN RAT SPINAL CORD <i>IN VIVO</i>	16
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
III. RESULTADOS.....	18
ARTÍCULO 3: Ca^{2+} -PERMEABLE AMPA RECEPTORS AND INTRACELLULAR Ca^{2+} DETERMINE MOTONEURON VULNERABILITY IN RAT SPINAL CORD <i>IN VIVO</i>	18

ARTÍCULO 4: CALPAIN INHIBITION PROTECTS SPINAL MOTONEURONS FROM THE EXCITOTOXIC EFFECTS OF AMPA *IN VIVO*.....19

IV. DISCUSIÓN.....20

EL PAPEL DEL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE GLUTAMATO EN LA MÉDULA ESPINAL Y SU RELACIÓN CON LA NEURODEGENERACIÓN..... 22

PAPEL DE LA SOBREATIVACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA Y KAINATO EN LA MÉDULA ESPINAL.....23

PAPEL DE LA SOBREATIVACIÓN DE LOS RECEPTORES AMPA EN LA MUERTE DE LAS MOTONEURONAS.....24

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES AMPA PERMEABLES AL CALCIO EN LA VULNERABILIDAD SELECTIVA DE LAS MOTONEURONAS ESPINALES.....24

PAPEL DEL CALCIO Y LA MITOCONDRIA EN LA VULNERABILIDAD SELECTIVA DE LAS MOTONEURONAS.....26

ACTIVACIÓN DE LA CALPAÍNA Y SU IMPLICACIÓN EN LA MUERTE DE LAS MOTONEURONAS.....26

ARTÍCULO 5: TARGETED THERAPIES PROVIDING NEW TREATMENT STRATEGIES FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS.....28

V. CONCLUSIONES.....29

REFERENCIAS.....30

RESUMEN

Los mecanismos de la degeneración selectiva de las motoneuronas en la esclerosis lateral amiotrófica esporádica son desconocidos. Un posible mecanismo es la excitotoxicidad mediada por la sobreactivación de los receptores de glutamato, particularmente del tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA). Receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2 son permeables a Ca^{2+} y la entrada de este catión puede ser responsable de la vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas espinales. El objetivo de esta tesis fue evaluar esta hipótesis *in vivo*, utilizando un modelo de rata, en el cual el AMPA perfundido por microdiálisis en la médula espinal lumbar, produce parálisis ipsilateral y una severa pérdida de las motoneuronas en la médula espinal. En este modelo, nosotros probamos el efecto protector de la 1-naftil acetil espermina (NAS) un bloqueador selectivo de los receptores AMPA permeables al Ca^{2+} , y del quelante de calcio intracelular [1,2-bis (2-amino fenoxi) etano-*N,N,N',N'*-tetrakis ácido tetra acético (acetoxi metil ester)] (BAPTA-AM). Ambos componentes cuando fueron coperfundidos con AMPA, previnieron completamente la parálisis y redujeron la pérdida de motoneuronas. Además, la coperfusión de piruvato como un sustrato metabólico energético, protegió de manera similar contra la parálisis y la muerte de las motoneuronas producida por el AMPA. Estos resultados sugieren que los receptores AMPA funcionales que carecen de la subunidad GluR2 están presentes en la médula espinal de la rata y que la muerte de las motoneuronas es producida por un incremento en el Ca^{2+} intracelular, vía receptores AMPA permeables al Ca^{2+} . Nuestros hallazgos de que el piruvato, un sustrato oxidable también protegió contra la pérdida de motoneuronas y contra la parálisis, indica que un incremento en el Ca^{2+} intracelular probablemente interfiere con el metabolismo energético mitocondrial. También estudiamos el curso temporal de los cambios neurodegenerativos producidos por el AMPA. El análisis histológico con violeta de cresilo mostró que el daño de las motoneuronas ocurre a partir de las 3 h y progresa hasta casi una pérdida total de motoneuronas a las 24 h. Sin embargo, la inmunohistoquímica para la colina acetiltransferasa (ChAT) reveló que la enzima empezó a disminuir a partir de 30 min después del experimento, lo cual sugiere que un paso inicial en la degeneración de las motoneuronas involucra un proceso que resulta en la pérdida del contenido de la enzima. En el mismo sentido, la inhibición de la calpaína por la aplicación de leupeptina protegió contra la pérdida de motoneuronas y contra la parálisis, lo cual podría indicar que la pérdida en el contenido de la ChAT producida por la administración del AMPA puede deberse a la activación de la calpaína que a su vez hidroliza la ChAT.

ABSTRACT

The mechanisms of motoneuron degeneration in sporadic amyotrophic lateral sclerosis are unknown. One possible mechanism is the excitotoxicity mediated by overactivation of glutamate receptors, particularly the α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) type. AMPA receptors lacking the GluR2 subunit are permeable to Ca^{2+} and the entrance of this cation might be responsible for the selective vulnerability of spinal motoneurons. The aim of the present work was to evaluate this hypothesis *in vivo*, using a rat model in which AMPA, perfused by microdialysis in the rat lumbar spinal cord, produces ipsilateral paralysis and a remarkable loss of spinal motoneurons. In this model, we tested the protective effect of 1-naphthyl acetyl spermine (NAS), a selective blocker of the Ca^{2+} -permeable AMPA receptors and the intracellular Ca^{2+} chelator [1,2-*bis* (2-aminophenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester)] (BAPTA-AM). Both compounds, when were coperfused with AMPA, completely prevented the paralysis and reduced the loss of motoneurons. In addition, coperfusion of pyruvate, an energy metabolic substrate, similarly prevented the paralysis and the motoneuron death produced by AMPA. These results can suggest that functional AMPA receptors lacking the GluR2 subunit are present in the rat spinal cord, and that motoneuron death is triggered by an increase of intracellular Ca^{2+} via such Ca^{2+} -permeable AMPA receptors. Our finding that pyruvate, an oxidizable substrate, also protected against the AMPA-induced motoneuron loss and paralysis, indicates that the increased intracellular Ca^{2+} probably interferes with the mitochondrial energetic metabolism. We have also studied the time course of neurodegenerative changes produced by AMPA. The histology with cresyl violet staining showed that motoneuron damage starts at about 3 h and progresses until reaching an almost complete motoneuron loss at 24 h. However, choline acetyltransferase (ChAT) immunohistochemistry showed that the enzyme seems already decreased from 30 min after the experiment, suggesting that one initial step in motoneuron degeneration involves a process leading to a decrement in the enzyme content. The inhibition of calpain by the administration of leupeptin protected against the motoneuron loss and paralysis, which suggest that the loss in the ChAT content produced by AMPA administration is due to the activation of calpain, which in turn hydrolyzes ChAT.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis está dividida en 6 partes: Introducción, Antecedentes, Objetivos, Resultados, Discusión y Conclusiones. No hay una sección de metodología debido a que esta se describe detalladamente en los artículos incluidos en los antecedentes y en los resultados.

En la Introducción se habla de las sinapsis glutamatérgicas y de los distintos tipos de receptores al glutamato, aspectos incluidos en el artículo 1, titulado: "Mecanismos de neurodegeneración" (Mensaje Bioquímico, Vol. XXIX, 17-28, 2005). En este trabajo, se menciona la relación entre la excitotoxicidad y las enfermedades neurodegenerativas, específicamente con la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

En los Antecedentes se describen más a fondo los dos tipos de ALS, así como las distintas hipótesis que se han postulado para explicar la muerte selectiva de las motoneuronas. Se incluye el artículo 2 titulado: "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, 2004). Incluye la metodología utilizada y se revisa la hipótesis excitotóxica de la esclerosis lateral amiotrófica esporádica *in vivo* en la médula espinal, utilizando varias estrategias experimentales. Este trabajo formó parte de mi tesis de Maestría.

En los Resultados se incluyen dos artículos. El primero de ellos titulado: "Ca²⁺-permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord *in vivo*" publicado recientemente (*Neuropharmacology*, 52; 1219-1228, 2007), y el segundo, "Calpain inhibition protects spinal motoneurons from the excitotoxic effects of AMPA *in vivo*", el cual es un manuscrito que se enviará próximamente para su publicación.

En la Discusión, se resumen y se integran las discusiones de cada uno de los artículos. Se incluye en esta sección el artículo 5, titulado: "Targeted therapies providing new treatment strategies for amyotrophic lateral sclerosis", enviado a publicación, en el cual se revisa con más detalle la excitotoxicidad mediada por los receptores AMPA, carentes de la subunidad GluR2 o con una edición incorrecta de esta subunidad, y cómo la entrada de Ca²⁺ a través de este tipo de receptores AMPA produce muerte neuronal. Se revisan así mismo sobre estas bases, algunas posibles estrategias terapéuticas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	esclerosis lateral amiotrófica
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
4-AP	4-aminopiridina
BAPTA-AM	1,2-Bis (2-amino fenoxi) etano- <i>N,N,N',N'</i> -tetrakis ácido tetra acético (acetoxi metil ester)]
ChAT	colina acetiltransferasa
NBQX	2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo [f] quinoxalina-7-sulfonamida sal disodio
NAS	1-Naftil acetil espermina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PDC	ácido L-trans-2,4-pirrolidindicarboxílico
SNC	sistema nervioso central
SOD1	superóxido dismutasa 1

I. INTRODUCCIÓN

El glutamato es considerado el principal aminoácido excitador en el sistema nervioso central (SNC). Su papel en el metabolismo celular es bien conocido, y este aminoácido se encuentra distribuido ampliamente a través de todo el SNC. Una de las principales dificultades en reconocer al glutamato como neurotransmisor fue el hecho de que hay solo un pequeño porcentaje de glutamato presente en vesículas sinápticas, y la gran parte del aminoácido está presente como parte del metabolismo intermediario.

El glutamato está involucrado en muchos aspectos de la función cerebral normal, como la cognición, la memoria, el aprendizaje, el desarrollo, la migración celular, la diferenciación y la muerte neuronal. Como podemos observar en la Fig. 1 del artículo 1, el glutamato se libera en las sinapsis glutamatérgicas, y se remueve del espacio sináptico por los distintos tipos de transportadores ubicados tanto en las neuronas presinápticas, como en las células gliales. Existen varios tipos de receptores a glutamato, tanto del tipo metabotrópico, los cuales transducen la señal por activación de procesos enzimáticos asociados a proteínas G y la producción de segundos mensajeros, como del tipo ionotrópico que son canales iónicos (Hollmann y Heinemann, 1994). En la Fig. 2 del artículo 1, se describen las distintas familias y subtipos de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos. El canal iónico del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) es permeable al Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , y su apertura depende de voltaje, ya que el Mg^{2+} que normalmente bloquea el poro del canal es expulsado al despolarizarse la membrana, dejando el canal susceptible a abrirse (Nakanishi, 1992). La regulación de la apertura del canal NMDA es compleja ya que además del sitio de reconocimiento para el glutamato, el receptor es modulado por glicina que es su co-agonista esencial y tiene sitios para moduladores positivos como las poliaminas, y otros para Mg^{2+} , Zn^{2+} , protones y agentes reactivos redox. Todos los receptores ionotrópicos tienen estructuras hetero-oligoméricas y un número de diferentes subunidades que ya han sido clonadas y caracterizadas (Hollmann y Heinemann, 1994).

Los receptores tipo NMDA tienen una subunidad NR1, que puede tener hasta ocho variantes debido al empalme alternativo de su RNAm, y cuatro subunidades NR2, que en la rata son designadas como A, B, C y D. No se conoce con certeza la estequiometría o composición nativa de las subunidades del receptor NMDA. Los canales pueden ser tetrámeros o pentámeros y la hipótesis más aceptada es que los canales nativos están siempre ensamblados por una subunidad NR1 y una o más tipos NR2 (Hollmann y Heinemann, 1994).

Los receptores tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) son independientes del voltaje, son permeables al Na^+ y K^+ y generalmente no son permeables al Ca^{2+} . Están formados por cuatro diferentes subunidades, designadas como GluR1 a GluR4. En el artículo 3 y 5, se da una explicación mucho más detallada sobre los receptores AMPA, en

especial de aquellos que carecen de la subunidad GluR2 y que por lo tanto son permeables al Ca^{2+} .

Los receptores tipo kainato están ensamblados en homo o heterodímeros de las subunidades GluR5, GluR6, GluR7, los cuales tienen una baja afinidad por el kainato, y las subunidades KA1 y KA2 que tienen una alta afinidad. Todas estas subunidades tienen la estructura básica de los receptores AMPA/kainato (Bettler y Mülle, 1995).

EXCITOTOXICIDAD Y NEURODEGENERACIÓN

Fue en 1949, cuando Krebs y sus colaboradores demostraron que el glutamato estaba más concentrado en la materia gris cerebral que en la materia blanca (Krebs et al., 1949). Después Hayashi realizó los primeros trabajos sobre de las propiedades excitadoras del glutamato (Hayashi, 1952; 1958). Casi al mismo tiempo, Lucas y Newhouse demostraron que el glutamato podría ser neurotóxico, ya que su administración sistémica en ratones inmaduros causaba degeneración retinal (Lucas y Newhouse, 1957). Curtis, Phillis y Watkins subsecuentemente demostraron que el glutamato y el aspartato, cuando se aplicaban iontoforéticamente en la médula espinal del gato, producían despolarización de las motoneuronas (Curtis et al., 1959). Olney demostró que la administración oral de glutamato a roedores inmaduros y primates resultaba en degeneración neuronal en áreas cerebrales que carecían de barrera hematoencefálica (Olney y Ho, 1970; Olney et al., 1972). Esto condujo al concepto de excitotoxicidad debido a la asociación de la sobreactivación de los receptores a glutamato con el daño neuronal.

Se ha considerado que la excitotoxicidad inducida por el glutamato endógeno podría estar participando en algunas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Huntington, de Parkinson, de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

Por lo tanto, en los últimos años se ha incrementado el interés en estudiar los mecanismos responsables de la muerte neuronal y su relación con la excitotoxicidad. Estos mecanismos son muy importantes en el SNC ya que la neurodegeneración puede ocurrir durante el envejecimiento, pero también durante padecimientos agudos y crónicos tales como accidentes vasculares cerebrales (isquemia/anoxia), hipoglicemia y epilepsia.

La excesiva activación de los receptores de glutamato produce una serie de fenómenos que culminan con la muerte de las neuronas, como se describe con detalle en el artículo 1. En este se revisan las sinapsis glutamatérgicas y los distintos tipos de receptores al glutamato así como su posible relación con las enfermedades neurodegenerativas.

EL CALCIO Y LA MUERTE NEURONAL

El Ca^{2+} es un importante mensajero intracelular en condiciones fisiológicas, las neuronas poseen mecanismos homeostáticos especializados para mantener los niveles de Ca^{2+} citosólicos, a través de una compleja interacción entre la salida, la entrada, el amortiguamiento y el almacenamiento interno de este ión (Arundine y Tymianski, 2003). Sin embargo, un incremento descontrolado en la concentración de Ca^{2+} puede producir daño y muerte neuronal debido a la activación de proteasas como la calpaína y otras enzimas líticas así como la producción de especies reactivas de oxígeno y alteraciones del metabolismo energético mitocondrial.

LAS CALPAÍNAS

Las calpaínas constituyen una familia de proteasas de cisteína activadas por Ca^{2+} que pueden modular una gran variedad de procesos fisiológicos, pero también, pueden estar participando en la muerte neuronal en varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la ALS. Las calpaínas pueden tener muchos sustratos que incluyen receptores de membrana (receptores AMPA, NMDA, ATPasa Ca^{2+} , intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje), proteínas del citoesqueleto, citocinas, factores de transcripción, fosfatasa, proteínas G, proteína cinasa C, fosfolipasa C y la calpastatina que es un inhibidor endógeno, que regula la actividad de la calpaína (Wang, 2000; Ray y Banik, 2003). La presencia de una gran variedad de sustratos para las calpaínas, y su activación en respuesta a un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, sugiere que las calpaínas pueden estar involucradas en un gran número de cambios estructurales, enzimáticos y transcripcionales.

Las calpaínas se encuentran principalmente en el citosol de todas las células. En mamíferos, se han descrito 15 isoformas específicas de tejido y dos isoenzimas ubicuas: microcalpaína (μ -calpaína), o calpaína-I, y milicalpaína (m-calpaína), o calpaína-II, las cuales requieren bajas (micromolares) o altas (milimolares) concentraciones de Ca^{2+} , respectivamente, para su activación. Las calpaínas son heterodímeros que tienen dos subunidades, una subunidad catalítica de aproximadamente 80 kDa y una subunidad común de 29 kDa. Las calpaínas existen generalmente como pro-enzimas en una forma inactiva en el citosol, sin embargo, un aumento en la concentración de Ca^{2+} dispara su activación, el proceso de activación puede también depender de la cantidad de calpaína y el sitio de activación (Ray y Banik, 2003; Harwood et al., 2005).

Se han propuesto dos mecanismos para la activación *in vivo* de la calpaína. El primer mecanismo propone que un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en el citosol produce la autólisis de las porciones pro péptido N-terminal de ambas subunidades, resultando en un cambio conformacional en la molécula y separación de las subunidades truncadas

produciendo la activación de la calpaina (Imajoh et al., 1986; Inomata et al., 1988). El segundo mecanismo propone que altos niveles en la concentración de Ca^{2+} intracelular produce la translocación de la calpaina inactiva desde el citosol a la membrana, donde ocurre su activación sin autólisis a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} y en presencia de efectores en la membrana tales como los fosfolípidos y una proteína activadora (Saido et al., 1991; Molinari et al., 1994; Melloni et al., 1998a). La proteína activadora de calpaina se une a la subunidad catalítica, promoviendo su disociación del heterodímero. Una vez activada en la membrana, la calpaina difunde al citosol y es resistente a la acción inhibitoria de la calpastatina (Melloni et al., 1998b). La calpastatina es una proteína inhibitoria endógena ampliamente expresada y específica para la calpaina (Emori et al., 1987).

Como se menciona anteriormente la activación de la calpaina puede estar participando en la muerte neuronal, por lo tanto, inhibidores de la calpaina, incluyendo a la leupeptina han sido buenos neuroprotectores en varios modelos, *in vivo* e *in vitro*, de neurotoxicidad, incluyendo hipoxia, isquemia, daño de médula espinal, del nervio ciático y excitotoxicidad (Di Stasi et al., 1991; Caner et al., 1993; Rami y Kriegstein, 1993; Brorson et al., 1994; Harding et al., 1996; Rami et al., 1997; Banik et al., 1998; Schumacher et al., 2000; Ding et al., 2002; Ray y Banik, 2003; Kieran y Greensmith, 2004; Araujo y Carvalho, 2005; McCollum et al., 2006).

REGULACIÓN DE CALCIO POR LA MITOCONDRIA

La principal función de la mitocondria es la producción de ATP. Pero también tiene otras funciones tales como el amortiguamiento del Ca^{2+} intracelular y participa en los eventos de apoptosis. Estas funciones y otras propiedades de las mitocondrias son relevantes en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas tales como la ALS. Hay evidencia que indica que las motoneuronas son particularmente vulnerables a alteraciones mitocondriales y a las cascadas de señalización dependientes de Ca^{2+} , por lo tanto una alteración en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular puede tener una gran importancia en la patogénesis de ALS.

Se ha demostrado que hay anomalías mitocondriales tanto morfológicas, como bioquímicas en pacientes con ALS esporádica; también se han encontrado incrementos en el volumen mitocondrial, aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, así como en los niveles de calcio dentro de las mitocondrias, en biopsias de músculo de pacientes (Siklos et al., 1996). Las motoneuronas requieren un constante suministro de energía para producir potenciales de acción, pero son incapaces de almacenar una gran cantidad de energía, necesaria para la síntesis de ATP. A diferencia de otros tipos celulares dentro del SNC, las motoneuronas tienen largos procesos axonales en comparación con el cuerpo celular, esta es una característica que requiere de un flujo constante de energía. Esto sugiere, que las

motoneuronas pueden ser sensibles a alguna perturbación en la producción energética mitocondrial, quizás más que otros grupos neuronales (Menzies et al., 2002).

Al ser la mitocondria el sitio de la fosforilación oxidativa consume aproximadamente 98% del requerimiento de oxígeno de la célula, haciéndola un importante sitio de formación de especies reactivas de oxígeno tal como el superóxido y radicales hidroxilo. En la cadena respiratoria mitocondrial hay dos sitios donde el oxígeno puede ser parcialmente reducido a superóxido. El primero es la vía ubiquinol-citocromo b del complejo III y el segundo es el de la NADH deshidrogenasa del complejo I (Dykens, 1997). La mayoría del superóxido producido en esas reacciones es convertido por acción de la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) a peróxido de hidrógeno. La reacción del superóxido con peróxido de hidrógeno puede luego resultar en la producción de hidroxilo. El superóxido puede también reaccionar con el óxido nítrico y formar peroxinitrito (Menzies et al., 2002).

Como se mencionó anteriormente, la mitocondria tiene una alta capacidad de almacenaje de Ca^{2+} ya que puede regular cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular, manteniendo la homeostasis celular que es requerida para el funcionamiento neuronal. Se ha demostrado que una excesiva entrada de Ca^{2+} a la mitocondria incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, disminuye la síntesis de ATP, produce liberación de citocromo c, e induce la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (Brustovetsky et al., 2002; Sullivan et al., 2005). También se ha demostrado en varios trabajos, que este daño mitocondrial está muy relacionado con alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} en la ALS familiar y esporádica (Swerdlow et al., 1998; Menzies et al., 2002; Manfredi y Xu, 2005; von Lewinski y Keller, 2005).

El piruvato, es el metabolito final de la glucólisis, es usado por las células como un sustrato energético y puede contribuir al reestablecimiento de la producción energética, protegiendo así contra la neurodegeneración (Maus et al., 1999). También se ha demostrado que el piruvato tiene actividad antioxidante o de atrapador de especies reactivas de oxígeno (Desagher et al., 1997; Kim et al., 2005). Otros sustratos energéticos han sido usados como la creatina la cual inhibe el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial, y la minociclina, la cual bloquea la salida del citocromo c (Klivenyi et al., 1999; Zhu et al., 2002; Zhang et al., 2003).

A continuación se incluye el artículo 1, ya publicado, que se integra a la presente introducción.

ARTÍCULO 1

“Mecanismos de neurodegeneración”

(*Mensaje Bioquímico*. Vol. **XXIX**, 17-28, 2005)

II. ANTECEDENTES

ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS), es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la pérdida progresiva y selectiva de las motoneuronas, principalmente de la región lumbar de la médula espinal y el tallo cerebral así como de las motoneuronas superiores de la corteza cerebral. Esta degeneración causa una parálisis progresiva que comienza en las extremidades inferiores produciendo una atrofia progresiva del músculo esquelético que puede llegar a los músculos de la mandíbula, también presenta un debilitamiento progresivo, atrofia muscular que causa rigidez e interfieren con el caminar y el habla. La palabra "Esclerosis" significa endurecimiento, "Lateral" se refiere a la parte lateral de la médula espinal donde se ubica el daño y por último "A-mio-trófica" que proviene del griego y significa "sin-nutrimiento-muscular" o atrofia muscular. Inicialmente, fue descrita por el famoso neurobiólogo francés Jean-Martin Charcot en 1872, y por eso, se le conoció como enfermedad de Charcot. La ALS es ahora familiarmente conocida en Estados Unidos como enfermedad de Lou Gehrig en honor al gran beisbolista quien desarrolló la enfermedad en la década de los 30. La ALS también ha afectado a otros personajes, como el astrofísico nominado al premio Nobel Stephen Hawking, quien sufre de un tipo no usual de la enfermedad con una lenta progresión. Estos ejemplos de la enfermedad nos muestran que ésta no afecta la capacidad intelectual de los enfermos, ni los órganos de los cinco sentidos (tacto, vista, oído, gusto y olfato) a pesar de la parálisis. La enfermedad culmina con la muerte a causa de un paro respiratorio como consecuencia de la denervación de los músculos respiratorios, aproximadamente 3-5 años después de ser diagnosticada (Gurney et al., 1998; Cleveland y Rothstein, 2001; Julien, 2001). Es un padecimiento con una prevalencia de 2-5 casos por cada 100,000 habitantes. La edad típica para el comienzo de la ALS es entre 50 y 60 años, aunque hay casos raros en jóvenes.

Tabla 1 Posibles mecanismos que pueden contribuir al daño de las motoneuronas y a la muerte celular en la ALS

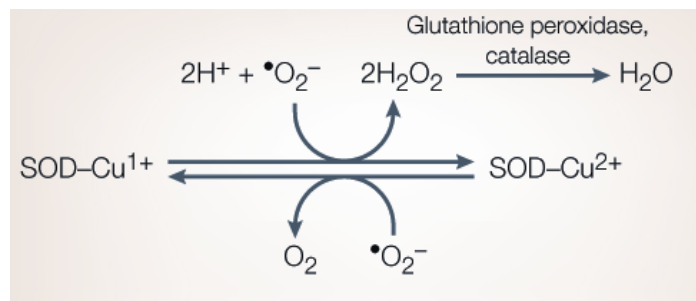
- Excitotoxicidad
- Factores genéticos (Mutaciones en la SOD1)
- Estrés oxidativo
- Daño mitocondrial
- Agregación de proteínas
- Daño del transporte axonal
- Inflamación
- Deficiencia de factores de crecimiento
- Desorganización de neurofilamentos

Se ha postulado que el proceso patológico de la ALS podría ser multifactorial, por lo tanto el mecanismo preciso de la muerte selectiva de las motoneuronas en la ALS es aún desconocido. Se ha sugerido que hay una compleja participación de múltiples mecanismos que incluyen a la excitotoxicidad, factores genéticos, estrés oxidativo, agregación de proteínas, estrangulación axonal por la acumulación anormal de neurofilamentos y daño mitocondrial (Tabla 1).

La ALS es esporádica en un 90% de los casos y el 10% restante son de origen genético o familiar.

ALS FAMILIAR

La ALS familiar representa solo el 10% de los casos, de los cuales el 20% de estos casos se han asociado con mutaciones en el gene que codifica para la enzima $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Rosen et al., 1993), esta enfermedad tiene un patrón de herencia autosómica dominante. La enzima SOD1 se expresa en casi todas las células del organismo y se encuentra tanto en células neuronales como no neuronales del SNC (Pardo et al., 1995). Es un homodimero de 153 aminoácidos y su principal función enzimática es la de catalizar la conversión del radical superóxido a peróxido de hidrógeno:



La SOD1 contiene los iones $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$, el átomo de cobre se encuentra presente en el sitio activo de la enzima, el cual es alternadamente reducido y oxidado por el superóxido (Liochev y Fridovich, 2000). El zinc le da estabilidad estructural a la proteína. El radical superóxido es un intermediario muy reactivo formado por la reducción del O_2 en la cadena respiratoria y es un poderoso agente oxidante, por lo que si sus niveles no son controlados puede llevar a la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas. Por esta razón, cualquier cambio en la función enzimática de la SOD1 puede tener consecuencias devastadoras para el ambiente celular (Coyle y Puttfarcken, 1993; Olanow, 1993; Gurney et al., 1998; Kruman et al., 1999).

Desde su descubrimiento, más de 125 diferentes mutaciones han sido identificadas a través del gene de la SOD1. Muchas de estas mutaciones resultan por la sustitución de un aminoácido (Cleveland y Rothstein, 2001). A partir de esto se han desarrollado ratones transgénicos con el

gene humano mutado de la SOD1, como el G93A (Gurney et al., 1994) que tiene cambiada una glicina por una alanina en posición 93 y uno que tiene una mutación en el gen murino G86R (Cleveland, 1999; Morrison y Morrison, 1999). También se han desarrollado, dos ratas transgénicas que expresan dos diferentes mutaciones de la SOD1, G93A y H46R, que de igual manera desarrollan parálisis y selectiva pérdida de motoneuronas (Nagai et al., 2001; Howland et al., 2002).

Los mecanismos de la degeneración de las motoneuronas producidos por la SOD1 mutada son aun inciertos. Sin embargo esta demostrado que la toxicidad mediada por la SOD1 mutada en la ALS no es debido a la perdida en su función, si no mas bien a una ganancia de una o mas propiedades toxicas que son independientes de los niveles de la actividad de la SOD1. Los principales argumentos contra la importancia de la perdida de la función como dismutasa son que: se ha desarrollado un ratón knockout de la SOD1 que, contrariamente a lo esperado no desarrolla la enfermedad de las motoneuronas (Reaume et al., 1996) y que los niveles de la actividad de la SOD1 no correlacionan con la enfermedad ni en humanos ni en ratones, de hecho algunas enzimas mutadas retienen toda su actividad de dismutasa (Borchelt et al., 1994; Bowling et al., 1995; Bruijn et al., 1997). Finalmente, un incremento crónico en los niveles de la SOD1 silvestre, no tiene efectos en la enfermedad (Bruijn et al., 1998).

Los animales transgénicos son normales al nacer y desarrollan una disfunción motora a los 3-7 meses de edad, la cual progresa rápidamente con la disminución en la movilidad de los miembros posteriores, hasta la parálisis total y la muerte prematura (Gurney et al., 1994; Nagai et al., 2001; Howland et al., 2002). El desarrollo de la enfermedad en estos animales parece estar relacionado con el número de copias del gen mutado que se introducen, con la cantidad de SOD1 mutada que se expresa, de forma que, los que expresan una mayor cantidad tienen un comienzo de la enfermedad más temprano que los que expresan una menor cantidad (Bruijn et al., 1997). Patológicamente, estos animales tienen degeneración de las motoneuronas de la médula espinal, con alteraciones en los componentes del citoesqueleto, astrocitosis, vacuolizaciones mitocondriales y algunos presentan inclusiones semejantes a cuerpos de Lewy. Estas alteraciones se asemejan mucho a las que se encuentran en biopsias de los pacientes con ALS.

Las alteraciones genéticas del 80% restante de los casos de ALS familiar son aún desconocidas. Sin embargo, recientemente se encontraron tres genes que producen casos raros de ALS familiar (ALS2 o alsin, ALS4 o senataxina y ALS8 o sinaptobrevina/proteínas de membrana asociadas a vesículas) (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001; Chen et al., 2004; Nishimura et al., 2004).

HIPÓTESIS DE LOS MECANISMOS DE LA ALS ESPORÁDICA

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar la etiología de la ALS esporádica, las cuales incluyen anomalías genéticas y no genéticas de proteínas del transporte axonal y del citoesqueleto (Julien, 2001; Hafezparast et al., 2003), del factor de crecimiento endotelial vascular (Oosthuysen et al., 2001; Azzouz et al., 2004), entre muchas otras. De todas estas una posible hipótesis que explique la selectiva muerte de las motoneuronas en la ALS es la excitotoxicidad mediada por los receptores AMPA, como veremos más adelante.

Las motoneuronas de la corteza motora envían sus axones a la médula espinal a través del tracto corticoespinal, estas motoneuronas utilizan glutamato como neurotransmisor, por lo tanto si las motoneuronas expresan abundantes receptores al glutamato, estos las pueden hacer más susceptibles al daño por excitotoxicidad.

La hipótesis excitotóxica de la ALS esporádica, se postuló debido a que inicialmente, se encontró que los niveles extracelulares de glutamato tanto en plasma (Plaitakis, 1990) así como en líquido cefalorraquídeo (Rothstein et al., 1990; Shaw et al., 1995; Spreux-Varoquaux et al., 2002) se encontraban aumentados en los pacientes con ALS esporádica, sugiriendo que la muerte de las motoneuronas en la enfermedad está asociada con un metabolismo anormal del glutamato lo cual produciría excitotoxicidad. Otros hallazgos demostraron que la actividad del transportador glial de glutamato (EAAT2 o GLT1) tenía una menor actividad en la médula espinal y corteza motora en los pacientes con ALS esporádica (Rothstein et al., 1992; Rothstein et al., 1995). Esta deficiencia o pérdida del transportador de glutamato provocaría un aumento en la concentración extracelular de glutamato y la consecuente sobreactivación de los receptores de glutamato (Rothstein et al., 1992; Rothstein et al., 1995). En apoyo a esta hipótesis, otros estudios demostraron que la inhibición farmacológica del transporte de glutamato en cultivos de médula espinal (Rothstein et al., 1993; Rothstein y Kuncl, 1995; Carriedo et al., 1996), así como el bloqueo de la expresión del transportador GLT1 con oligonucleótidos antisentido *in vivo* (Rothstein et al., 1996) causaron muerte selectiva de motoneuronas.

VULNERABILIDAD SELECTIVA DE LAS MOTONEURONAS

Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que las motoneuronas son diferencialmente más vulnerables a la muerte neuronal mediada por los receptores tipo AMPA, que otros tipos neuronales (Hugon et al., 1989; Rothstein et al., 1993; Kwak y Nakamura, 1995a; b; Carriedo et al., 1996; Van Den Bosch et al., 2000; Vandenberghe et al., 2000). Las motoneuronas al parecer tienen propiedades intrínsecas las cuales están muy relacionadas con la entrada de Ca^{2+} , lo que las haría más vulnerables a la muerte mediada por Ca^{2+} , debido a su limitada habilidad

para poder amortiguar este catión, debido a su bajo contenido de proteínas quelantes de calcio, como la calbindina y la parvalbumina (Ince et al., 1993; Alexianu et al., 1994; Palecek et al., 1999). Este aspecto se discutirá con mayor detalle más adelante. Los mecanismos de la vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas a la sobreactivación de los receptores tipo AMPA no se conocen aún con detalle. En principio, tal vez las diferencias en la vulnerabilidad a los agonistas de los receptores tipo AMPA entre las motoneuronas y otras neuronas espinales podrían resultar de diferencias en la expresión del receptor tipo AMPA y/o de diferencias en fenómenos que estarían modulando la entrada de Ca^{2+} . Se han propuesto dos mecanismos que pueden explicar la selectiva muerte de las motoneuronas mediada por los receptores tipo AMPA observada en la ALS. El primero es una selectiva disminución en la expresión de la subunidad GluR2 de los receptores tipo AMPA, lo cual, resulta en una disminución en la proporción de receptores que la contienen y por lo tanto, habría receptores con mayor permeabilidad al Ca^{2+} . Los receptores AMPA en si tienen una baja abundancia de la subunidad GluR2 entre las cuatro subunidades. El segundo es una reducción en la edición del RNA de la subunidad GluR2, lo cual resulta en receptores que contengan la subunidad GluR2 con una arginina (Q) no editada, lo cual resulta en una alta permeabilidad al Ca^{2+} (Kawahara et al., 2004).

En el siguiente artículo 2, se discuten los hallazgos de experimentos *in vivo* en los que se demuestra que la inhibición aguda del transportador de glutamato produce un aumento en la concentración extracelular del aminoácido pero ningún daño neuronal, mientras que la perfusión de AMPA produjo muerte de las motoneuronas y parálisis, *in vivo*.

ARTÍCULO 2

"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, 2004)

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo se formuló con base en los antecedentes, en particular a partir del artículo 2 que precede a esta sección, el cual fue parte de mi tesis de Maestría. Así, el objetivo general fue determinar si la muerte selectiva de las motoneuronas espinales ocasionada por la sobreactivación de los receptores AMPA, se debe fundamentalmente a la entrada de Ca^{2+} a través de este tipo de receptores, así como estudiar el curso temporal de la muerte de las motoneuronas y su relación con la parálisis. Otro objetivo fue probar estrategias de neuroprotección relacionadas con los efectos del incremento del Ca^{2+} intracelular y con un déficit energético.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estudiar los efectos de la 1-naftil acetil espermina (NAS), que bloquea selectivamente los receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2 y que por lo tanto, son altamente permeables a Ca^{2+} .
- 2.- Conocer la participación del Ca^{2+} intracelular en la muerte de las motoneuronas debido a la administración del AMPA. Para este objetivo se usó el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM.
- 3.- Determinar si la administración de piruvato puede tener efectos protectores contra la muerte neuronal que produce el AMPA debido a que pueda estar interfiriendo en el metabolismo energético mitocondrial.
- 4.- Estudiar el curso temporal de la neurodegeneración de las motoneuronas producida por el AMPA en tiempos más cortos; 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 hrs.
- 5.- Probar si la administración de inhibidores de la calpaína pueden tener efectos protectores y si es que esta proteasa está participando en la pérdida de la ChAT y en la muerte neuronal que produce el AMPA.

ARTÍCULO 4

"Calpain inhibition protects spinal motoneurons from the excitotoxic effects of AMPA *in vivo*"

(Manuscrito que se enviará próximamente para su publicación)

IV. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la correlación que existe entre la sobreactivación de los receptores tipo AMPA, la entrada de Ca^{2+} y la neurodegeneración de las motoneuronas en la médula espinal de la rata *in vivo* mediante la combinación de técnicas de microdiálisis, neuroquímicas, conductuales, inmunohistoquímicas e histológicas. Con los resultados obtenidos podemos confirmar que la vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas espinales ocasionada por la sobreactivación de los receptores tipo AMPA, se debió fundamentalmente a la entrada de Ca^{2+} a través de este tipo de receptores, y esta entrada de Ca^{2+} produjo una cascada de eventos que culminaron con la muerte de las motoneuronas. Los hallazgos más importantes se resumen e integran en la figura 1.

La técnica de microdiálisis nos permite por una parte, administrar sustancias de peso molecular <6.000 daltones que es el límite de la membrana de diálisis, sin que la droga llegue directamente al tejido de manera masiva. Su paso a través de la membrana es más lento y más constante durante el tiempo en que se hace la perfusión, por lo que sus efectos son más controlados. Por otra parte, la microdiálisis también nos permite monitorear los cambios en la concentración extracelular de varios compuestos, incluyendo neurotransmisores. Se han realizado estudios sobre la liberación de neurotransmisores y aminoácidos por microdiálisis en diferentes regiones cerebrales. Sin embargo, solo hay un estudio en el cual utilizan la misma técnica de microdiálisis en la médula espinal de la rata *in vivo* (Sundström et al., 1995). Nosotros recurrimos a utilizar la técnica de microdiálisis en la médula espinal, para lo cual usamos una cánula que es introducida transversalmente en el asta dorsal, pero sin tocar el asta ventral que es donde están las motoneuronas. Es de importancia hacer notar que la cánula de microdiálisis usada mide sólo 1.2 mm de longitud x 0.24 mm de diámetro, por lo que produce únicamente daño mecánico del asta dorsal ipsilateral, sin dañar mecánicamente las motoneuronas. A pesar de que la cánula de microdiálisis se introduce en el asta dorsal, las drogas administradas sí pueden difundir hasta alcanzar el asta ventral. Otra ventaja del sistema de microdiálisis es que el asta ventral contralateral funciona como control. Cabe mencionar que no hay ningún trabajo en la literatura en donde se hayan administrado por microdiálisis las drogas que usamos para correlacionarlo con el daño en las motoneuronas y para su protección.

EL PAPEL DEL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE GLUTAMATO EN LA MÉDULA ESPINAL Y SU RELACIÓN CON LA NEURODEGENERACIÓN

Como se mencionó anteriormente, una de las hipótesis para explicar los mecanismos de neurodegeneración de las motoneuronas en la ALS esporádica es la hipótesis excitotóxica, basada fundamentalmente en dos hallazgos: el primero, un aumento en los niveles de glutamato, tanto en plasma (Plaitakis, 1990) como en líquido cefalorraquídeo de pacientes con ALS (Rothstein et al., 1990; Shaw et al., 1995; Spreux-Varoquaux et al., 2002), y segundo, una disminución en el transportador glial de glutamato EAAT2 o GLT1 en la médula espinal y en la corteza cerebral en pacientes con ALS esporádica (Rothstein et al., 1992; Rothstein et al., 1995). Por lo tanto, una disminución en el transportador estaría causando una excesiva acumulación de glutamato en el espacio sináptico y en consecuencia sobreactivaría a sus receptores, lo que culminaría en muerte de las motoneuronas. Nosotros probamos diferentes estrategias para producir un aumento en la concentración extracelular de glutamato en la médula espinal: inhibición del transportador de glutamato con ácido L-trans-2,4-pirrolidindicarboxílico (PDC) y la estimulación de su liberación con 4-aminopiridina (4-AP). Como se muestra claramente en el artículo 2, los niveles extracelulares de glutamato se incrementaron por el PDC varias veces sobre el valor basal durante más de una hora y a pesar de este considerable aumento no se observaron alteraciones conductuales ni degeneración de las motoneuronas (Artículo 2, Fig. 2). Recientemente también se demostró que la administración de PDC en el hipocampo y la corteza motora de ratones transgénicos con mutación en la SOD1, a pesar del incremento en los niveles extracelulares de glutamato, no produjo muerte neuronal (Tovar-y-Romo y Tapia, 2006).

Así, una de las principales aportaciones de este trabajo es la demostración de que no hay una correlación entre el incremento en la concentración extracelular de glutamato producido por bloqueo de su transporte, y el daño de las motoneuronas. Una posible explicación para estos resultados es que el glutamato extracelular acumulado como consecuencia de la inhibición en su recaptura no es capaz de activar significativamente a los receptores postsinápticos de las motoneuronas. La carencia del efecto excitotóxico puede ser debido a una limitada difusión del glutamato en las astas ventrales, donde están las motoneuronas, ya que la cánula de microdiálisis fue colocada en las astas dorsales, pero nuestros resultados con AMPA, como se discute más adelante, indican que esto es poco probable. Nosotros no excluimos la posibilidad de que un bloqueo crónico del transporte de glutamato produzca un aumento extracelular persistente de glutamato por varios días o semanas, y esto pueda ser tóxico para las motoneuronas. Sin embargo, experimentos recientes del laboratorio demostraron

que la administración crónica de PDC durante 3 semanas no produjo daño a las motoneuronas (Tovar-y-Romo, Zepeda y Tapia en preparación).

Otra manera de producir aumento en la concentración extracelular de glutamato es por aumento en su liberación. Entre las drogas capaces de estimular la liberación de neurotransmisores están ciertos bloqueadores de canales de potasio, como la 4-AP. La 4-AP prolonga la fase de despolarización de los potenciales de acción, aumentando la frecuencia de disparo neuronal e induce la liberación de neurotransmisores tanto excitadores como inhibidores en diferentes preparaciones *in vitro*, en la placa neuromuscular (Lundh, 1978; Thesleff, 1980), rebanadas de cerebro (Hu et al., 1991; Schechter, 1997), sinaptosomas (Tapia y Sitges, 1982; Tapia et al., 1985) y en algunas regiones cerebrales *in vivo* (Morales-Villagrán y Tapia, 1996; Peña y Tapia, 1999; 2000; Ayala y Tapia, 2003). Esta liberación ocurre desde terminales sinápticas, ya que es inhibida por tetrodotoxina y por antagonistas de canales de Ca^{2+} tipo N (Peña y Tapia, 2000).

Como se describe en el artículo 2 (Fig. 1), los animales tratados con 4-AP mostraron solo contracciones de la pata ipsilateral, pero no mostraron parálisis ni muerte de las motoneuronas a pesar de un aumento transitorio en la concentración de glutamato. Esto nos indica que el glutamato liberado en las terminales presinápticas por la acción de la 4-AP, juega un papel importante en el aumento de la excitabilidad de las motoneuronas en la médula espinal, pero no lo suficiente para producir un daño excitotóxico, al menos en estas condiciones experimentales. Esto sugiere que las motoneuronas espinales pueden ser más resistentes a la excitotoxicidad mediada por la 4-AP, en comparación con otras regiones neuronales. Por lo tanto, el glutamato liberado por la 4-AP probablemente no alcanza la concentración sináptica necesaria para inducir neurodegeneración por sobreactivación de los receptores tipo AMPA, ya que, como se discutirá más adelante, la acción directa del AMPA sí fue capaz de producir muerte.

PAPEL DE LA SOBREATIVACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA Y KAINATO EN LA MÉDULA ESPINAL

Se ha demostrado que en la médula espinal de la rata hay relativamente poca o nula expresión de RNAm de las diferentes subunidades de los receptores NMDA y de kainato en las astas ventrales (Petrália et al., 2000; Wisden et al., 2000). Sin embargo, numerosos datos en la literatura indican que los receptores NMDA y kainato participan en la muerte neuronal en otras regiones del SNC. Nosotros encontramos que la perfusión de NMDA y kainato en la médula espinal de la rata no tuvo efectos neurotóxicos, sugiriendo que estos receptores no participan de manera importante en la excitotoxicidad de las motoneuronas espinales (Artículo 2, Fig. 4).

PAPEL DE LA SOBREATIVACIÓN DE LOS RECEPTORES AMPA EN LA MUERTE DE LAS MOTONEURONAS

Estudios de la expresión y distribución de las diferentes subunidades de los receptores AMPA en la médula espinal, muestran que en las astas ventrales los receptores AMPA predominan sobre los receptores NMDA y kainato (Petralia et al., 2000; Wisden et al., 2000). Esto explicaría la vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas espinales al daño por la sobreactivación de los receptores tipo AMPA, sin alteración en los niveles extracelulares de glutamato y aspartato (Artículo 3, Fig. 3). Todos los animales presentaron parálisis ipsilateral, la cual correlaciona con la muerte de las motoneuronas, ya que histológicamente la degeneración comenzó alrededor de las 3 horas y progresó hasta alcanzar una completa muerte neuronal a las 24 horas (Artículo 2, Figs. 3 y 5; Artículo 3 Figs. 2 y 6; Artículo 4, Figs. 2 y 4). La participación de los receptores AMPA se confirmó por la perfusión del antagonista de los receptores tipo AMPA, el 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo [f] quinoxalina-7-sulfonamida sal disodio (NBQX), el cual bloqueó totalmente las alteraciones en la conducta motora y la parálisis, y previno la degeneración de las motoneuronas producida por la administración de AMPA. (Artículo 2, Figs. 3 y 5). De manera similar, estos resultados son consistentes con los efectos neuroprotectores de los antagonistas de los receptores tipo AMPA sobre el daño en la médula espinal *in vivo* (Nakamura et al., 1994; Hirata et al., 1997; Liu et al., 1997), o *in vitro* (Carriedo et al., 1996; Van Den Bosch y Robberecht, 2000; Van Den Bosch et al., 2000).

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES AMPA PERMEABLES AL CALCIO EN LA VULNERABILIDAD SELECTIVA DE LAS MOTONEURONAS ESPINALES

Como se discutió en la sección precedente, los receptores tipo AMPA parecen participar de manera importante en la excitotoxicidad sobre las motoneuronas espinales. Una pregunta relevante es el mecanismo de la muerte neuronal mediada por estos receptores. Algunos trabajos han demostrado que las motoneuronas expresan receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2 y que por lo tanto, son altamente permeables a Ca^{2+} (Carriedo et al., 1996; Williams et al., 1997; Shaw et al., 1999). Entonces, ¿La muerte de las motoneuronas espinales que produce el AMPA se debe a un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , el cual entra a través de los receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2?

En este trabajo, se probaron dos estrategias para contestar esta pregunta. Como se demuestra en el artículo 3, la 1-naftil acetil espermina (NAS), que es un antagonista específico que bloquea los receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2 (Koike et al., 1997; Greig et al., 2000; Yin et al., 2002), protegió contra la muerte de las motoneuronas, contra la parálisis y contra las alteraciones motoras (artículo 3, Fig. 1 y 3). Esto indica claramente que hay

receptores AMPA sin la subunidad GluR2 permeables al Ca^{2+} que son funcionales *in vivo*. Previamente se había encontrado, en cultivos de motoneuronas la presencia de receptores AMPA permeables al Ca^{2+} con una tinción histoquímica con cobalto (Carriedo et al., 1996; Terro et al., 1998; Bar-Peled et al., 1999; Van Den Bosch y Robberecht, 2000; Van Den Bosch et al., 2000), y la toxina de araña Joro, que también bloquea selectivamente receptores AMPA que carecen de la subunidad GluR2, protegió contra el daño neuronal (Van Den Bosch y Robberecht, 2000; Van Den Bosch et al., 2000).

Sin embargo, había cierta controversia sobre la presencia de la subunidad GluR2 en los receptores AMPA en la médula espinal tanto de humanos como de rata (Tomiyama et al., 1996; Virgo et al., 1996; Williams et al., 1997; Bar-Peled et al., 1999), pero nuestros datos demuestran lo contrario.

El papel de los receptores AMPA permeables al Ca^{2+} en la muerte neuronal se ha demostrado en varios modelos animales, *in vivo* se demostró que ratones deficientes de la subunidad GluR2 tienen anomalías en la potenciación a largo plazo, pero no presentan muerte de las motoneuronas (Jia et al., 1996), en contraste en cultivos de hipocampo de este ratón que carece de la subunidad GluR2 si hay muerte neuronal (Iihara et al., 2001).

Con respecto a la edición del RNA en el sitio Q/R de la subunidad GluR2 de los receptores AMPA, se demostró en un ratón transgénico que la incorporación de una subunidad GluR2 artificial hace que los receptores AMPA sean permeables al Ca^{2+} , causando que estos ratones desarrollen degeneración de las motoneuronas en etapas tardías de su vida (Feldmeyer et al., 1999). Si los receptores AMPA permeables al Ca^{2+} tienen un papel fundamental en la muerte de las motoneuronas en la ALS, una disminución en la expresión de la subunidad GluR2 o una reducción en su edición pueden iniciar o acelerar la enfermedad.

Además de lo anterior, en el artículo 4 se muestra el curso temporal de la muerte de las motoneuronas, la cual comienza entre 3 y 6 horas después de administrado el AMPA, por lo tanto parece que la entrada de Ca^{2+} a través de estos receptores, resulta en un proceso intracelular que determina la muerte neuronal (Artículo 4, Fig. 2).

El BAPTA-AM es un éster altamente lipofílico capaz de entrar en las células, sus porciones acetoxi metil ester son deesterificadas intracelularmente por esterasas citoplásmicas no específicas para quelar al Ca^{2+} (Tsien, 1981). Un ión Ca^{2+} puede ser reversiblemente unido por cada molécula de BAPTA. En el artículo 3 de resultados, se muestra que el BAPTA-AM protegió significativamente contra muerte de las motoneuronas, contra la parálisis y contra las alteraciones motoras (Artículo 3, Fig. 1), sugiriendo claramente que el Ca^{2+} que entra a las motoneuronas es quelado previniendo sus efectos (Artículo 3, Figs. 4 y 6).

PAPEL DEL CALCIO Y LA MITOCONDRIA EN LA VULNERABILIDAD SELECTIVA DE LAS MOTONEURONAS

Una disfunción en la homeostasis intracelular del Ca^{2+} es un importante factor en el proceso de la muerte neuronal, debido a la activación de enzimas líticas, producción de especies reactivas de oxígeno y deficiencias de la función mitocondrial o alteraciones del metabolismo energético (Siesjo, 1994; Nicholls y Budd, 2000; Bano et al., 2005). En este sentido, en el artículo 3 se probó una estrategia de neuroprotección utilizando piruvato como un sustrato energético mitocondrial en la médula espinal de la rata, la administración de piruvato protegió contra la parálisis, contra las alteraciones motoras (Artículo 3, Fig. 1), así como contra la muerte de las motoneuronas producidas por el AMPA (Artículo 3, Figs. 5 y 6). Esto nos sugiere claramente que el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} interfiere con el metabolismo energético mitocondrial. Por lo tanto, si hay un déficit mitocondrial, este resulta en una disminución en la producción de ATP, y suministrando un sustrato energético como el piruvato, se puede contribuir al reestablecimiento de la producción energética y así proteger contra la neurodegeneración. Sin embargo, otro posible mecanismo de protección del piruvato puede ser debido a que esté actuando como un antioxidante o atrapador de radicales libres. Aunque nosotros no tenemos evidencia de producción de especies reactivas de oxígeno en nuestro modelo, *in vitro* la administración de AMPA a motoneuronas, se ha demostrado que produce especies reactivas de oxígeno (Carriedo et al., 2000). Recientemente también se demostró que el piruvato retraso el progreso de la enfermedad en el ratón transgénico SOD1 (Park et al., 2007).

Es interesante el hecho que tanto las motoneuronas espinales de humanos como de roedores, son vulnerables a la muerte mediada por Ca^{2+} debido a que tienen una limitada capacidad para poder amortiguar este catión, así como a su bajo contenido de proteínas quelantes de calcio, como la calbindina y la parvalbumina (Ince et al., 1993; Alexianu et al., 1994; Palecek et al., 1999). Por lo tanto una baja capacidad para amortiguar el Ca^{2+} intracelular es un importante factor de riesgo para la degeneración de las motoneuronas.

ACTIVACIÓN DE LA CALPAÍNA Y SU IMPLICACIÓN EN LA MUERTE DE LAS MOTONEURONAS

Uno de los mecanismos tóxicos del incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} es la activación de proteasas de cisteína tales como la calpaína. La colina acetiltransferasa (ChAT) es la enzima responsable para la biosíntesis de acetilcolina y es el indicador más específico para monitorear el estado funcional de las neuronas colinérgicas en el SNC y periférico. La pérdida de neuronas colinérgicas ha sido observada en varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo la ALS (Oda, 1999), por lo que tal vez una disminución en la expresión de la ChAT sea específica y un cambio temprano en la ALS. Como se demuestra en el Artículo 4, la

inmunohistoquímica de la ChAT reveló que la enzima empezó a disminuir a partir de 30 min y a las 3 h no se detectó inmunorreactividad (Artículo 4, Fig. 2), esto nos indicaría que un proceso inicial en la degeneración de las motoneuronas es la pérdida de la ChAT y esta muerte neuronal retrasada puede ser debida a un mecanismo intracelular activo mediado por la entrada de Ca^{2+} , involucrando la activación de la calpaína. El tratamiento con leupeptina que es un inhibidor de la calpaína, previno la parálisis y las alteraciones motoras (Artículo 4, Fig. 1), así como la pérdida de la inmunoreactividad de la ChAT y la muerte de las motoneuronas producida por el AMPA (Artículo 4, Figs. 3 y 4). En este mismo sentido, se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la calpaína es neuroprotectora en varios modelos de excitotoxicidad (Di Stasi et al., 1991; Caner et al., 1993; Rami y Krieglstein, 1993; Brorson et al., 1994; Wang et al., 1996; Rami et al., 1997).

En el Artículo 5, se revisa con más detalle la excitotoxicidad mediada por los receptores AMPA, la entrada de Ca^{2+} a través de la subunidad GluR2 y cómo esta entrada de Ca^{2+} produce muerte neuronal. Este conocimiento nos proporciona varios blancos para estrategias terapéuticas, que han demostrado ser parcialmente eficaces tanto en roedores como humanos con mutaciones en la SOD1 y en los pocos modelos *in vivo* existentes de neurodegeneración por excitotoxicidad.

ARTÍCULO 5

“Targeted therapies providing new treatment strategies for amyotrophic lateral sclerosis”

(Enviado a *Expert Opinion on Therapeutic Targets*)

V. CONCLUSIONES

1.- El efecto protector de la NAS contra la neurodegeneración de las motoneuronas que produce el AMPA, sugiere que la entrada de Ca^{2+} a través de receptores con la subunidad GluR2 es un importante factor para la muerte selectiva de las motoneuronas.

2.- La protección del BAPTA-AM contra la neurodegeneración de las motoneuronas, sugiere que el proceso de muerte involucra un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} debido a la entrada de este catión a través de los receptores AMPA.

3.- La administración de piruvato como un sustrato energético, también protegió contra la muerte de las motoneuronas, así un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} probablemente interfiere con el metabolismo energético mitocondrial.

4.- La histología con violeta de cresilo mostró que el daño de las motoneuronas ocurre progresivamente a partir de las 3 h y es máximo a las 24 h, sin embargo, la inmunohistoquímica de la ChAT indicó que desde la primera media hora la enzima empezó a disminuir, lo cual sugiere que el daño neuronal producido por la sobreactivación de los receptores AMPA se correlaciona con un proceso que resulta en la pérdida de la ChAT.

5.- La leupeptina, previno la pérdida de la ChAT y la muerte de las motoneuronas, lo cual sugiere que un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} involucra la activación de la calpaina y que esta proteasa disminuye el contenido de la ChAT aparentemente antes de que ocurra la neurodegeneración.

REFERENCIAS

- Alexianu M. E., Ho B. K., Mohamed A. H., et al. (1994) The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 36, 846-858.
- Araujo I. M. y Carvalho C. M. (2005) Role of nitric oxide and calpain activation in neuronal death and survival. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 319-324.
- Arundine M. y Tymianski M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34, 325-337.
- Ayala G. X. y Tapia R. (2003) Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus in vivo. *Neuropharmacology* 45, 649-660.
- Azzouz M., Ralph G. S., Storkebaum E., et al. (2004) VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 429, 413-417.
- Banik N. L., Shields D. C., Ray S., et al. (1998) Role of calpain in spinal cord injury: effects of calpain and free radical inhibitors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 844, 131-137.
- Bano D., Young K. W., Guerin C. J., et al. (2005) Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120, 275-285.
- Bar-Peled O., O'Brien R. J., Morrison J. H. y Rothstein J. D. (1999) Cultured motor neurons possess calcium-permeable AMPA/kainate receptors. *Neuroreport* 10, 855-859.
- Bettler B. y Mülle C. (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34, 123-139.
- Borchelt D. R., Lee M. K., Slunt H. S., et al. (1994) Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8292-8296.
- Bowling A. C., Barkowski E. E., McKenna-Yasek D., et al. (1995) Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 64, 2366-2369.
- Brorson J. R., Manzollillo P. A. y Miller R. J. (1994) Ca²⁺ entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 14, 187-197.
- Brujin L. I., Houseweart M. K., Kato S., et al. (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281, 1851-1854.
- Brujin L. I., Becher M. W., Lee M. K., et al. (1997) ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18, 327-338.
- Brustovetsky N., Brustovetsky T., Jemmerson R. y Dubinsky J. M. (2002) Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. *J. Neurochem.* 80, 207-218.
- Caner H., Collins J. L., Harris S. M., Kassell N. F. y Lee K. S. (1993) Attenuation of AMPA-induced neurotoxicity by a calpain inhibitor. *Brain Res.* 607, 354-356.
- Carriedo S. G., Yin H. Z. y Weiss J. H. (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J. Neurosci.* 16, 4069-4079.
- Carriedo S. G., Sensi S. L., Yin H. Z. y Weiss J. H. (2000) AMPA exposures induce mitochondrial Ca²⁺ overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci.* 20, 240-250.
- Cleveland D. W. (1999) From Charcot to SOD1: mechanisms of selective motor neuron death in ALS. *Neuron* 24, 515-520.
- Cleveland D. W. y Rothstein J. D. (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806-819.
- Coyle J. T. y Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689-695.
- Curtis D. R., Phillis J. W. y Watkins J. C. (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 183, 611-612.

- Chen Y. Z., Bennett C. L., Huynh H. M., et al. (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1128-1135.
- Desagher S., Glowinski J. y Premont J. (1997) Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J. Neurosci.* 17, 9060-9067.
- Di Stasi A. M., Gallo V., Ceccarini M. y Petrucci T. C. (1991) Neuronal fodrin proteolysis occurs independently of excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Neuron* 6, 445-454.
- Ding D., Stracher A. y Salvi R. J. (2002) Leupeptin protects cochlear and vestibular hair cells from gentamicin ototoxicity. *Hear. Res.* 164, 115-126.
- Dykens J. (1997) Mitochondrial free radical production and oxidative pathophysiology: implications for neurodegenerative disease., in *Mitochondria and Free Radicals in Neurodegenerative Disease.*, pp 29-51. Wiley, New York.
- Emori Y., Kawasaki H., Imajoh S., Imahori K. y Suzuki K. (1987) Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3590-3594.
- Feldmeyer D., Kask K., Brusa R., et al. (1999) Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat. Neurosci.* 2, 57-64.
- Greig A., Donevan S. D., Mujtaba T. J., Parks T. N. y Rao M. S. (2000) Characterization of the AMPA-activated receptors present on motoneurons. *J. Neurochem.* 74, 179-191.
- Gurney M. E., Liu R., Althaus J. S., Hall E. D. y Becker D. A. (1998) Mutant CuZn superoxide dismutase in motor neuron disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 21, 587-597.
- Gurney M. E., Pu H., Chiu A. Y., et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772-1775.
- Hadano S., Hand C. K., Osuga H., et al. (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat. Genet.* 29, 166-173.
- Hafezparast M., Klocke R., Ruhrberg C., et al. (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300, 808-812.
- Harding D. I., Greensmith L., Connold A. L. y Vrbova G. (1996) Stabilizing neuromuscular contacts increases motoneuron survival after neonatal nerve injury in rats. *Neuroscience* 70, 799-805.
- Harwood S. M., Yaqoob M. M. y Allen D. A. (2005) Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann. Clin. Biochem.* 42, 415-431.
- Hayashi T. (1952) A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. *Jpn. J. Physiol.* 3, 46-64.
- Hayashi T. (1958) Inhibition and excitation due to gamma-aminobutyric acid in the central nervous system. *Nature* 182, 1076-1077.
- Hirata A., Nakamura R., Kwak S., Nagata N. y Kamakura K. (1997) AMPA receptor-mediated slow neuronal death in the rat spinal cord induced by long-term blockade of glutamate transporters with THA. *Brain Res.* 771, 37-44.
- Hollmann M. y Heinemann S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 31-108.
- Howland D. S., Liu J., She Y., et al. (2002) Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1604-1609.
- Hu P. S., Benishin C. y Fredholm B. B. (1991) Comparison of the effects of four dendrotoxin peptides, 4-aminopyridine and tetraethylammonium on the electrically evoked [3H]noradrenaline release from rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 209, 87-93.
- Hugon J., Vallat J. M., Spencer P. S., Leboutet M. J. y Barthe D. (1989) Kainic acid induces early and delayed degenerative neuronal changes in rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 104, 258-262.

- Iihara K., Joo D. T., Henderson J., et al. (2001) The influence of glutamate receptor 2 expression on excitotoxicity in GluR2 null mutant mice. *J. Neurosci.* 21, 2224-2239.
- Imajoh S., Kawasaki H. y Suzuki K. (1986) Limited autolysis of calcium-activated neutral protease (CANP): reduction of the Ca²⁺-requirement is due to the NH₂-terminal processing of the large subunit. *J. Biochem. (Tokyo)* 100, 633-642.
- Ince P., Stout N., Shaw P., et al. (1993) Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 19, 291-299.
- Inomata M., Kasai Y., Nakamura M. y Kawashima S. (1988) Activation mechanism of calcium-activated neutral protease. Evidence for the existence of intramolecular and intermolecular autolyses. *J. Biol. Chem.* 263, 19783-19787.
- Jia Z., Agopyan N., Miu P., et al. (1996) Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* 17, 945-956.
- Julien J. P. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell* 104, 581-591.
- Kawahara Y., Ito K., Sun H., et al. (2004) Glutamate receptors: RNA editing and death of motor neurons. *Nature* 427, 801.
- Kieran D. y Greensmith L. (2004) Inhibition of calpains, by treatment with leupeptin, improves motoneuron survival and muscle function in models of motoneuron degeneration. *Neuroscience* 125, 427-439.
- Kim H. J., Kim J. M., Park J. H., et al. (2005) Pyruvate protects motor neurons expressing mutant superoxide dismutase 1 against copper toxicity. *Neuroreport* 16, 585-589.
- Klivenyi P., Ferrante R. J., Matthews R. T., et al. (1999) Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* 5, 347-350.
- Koike M., Iino M. y Ozawa S. (1997) Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca²⁺-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 29, 27-36.
- Krebs H. A., Eggleston L. V. y Hems R. (1949) Distribution of glutamine and glutamic acid in animal tissues. *Biochem. J.* 44, 159-163.
- Kruman, II, Pedersen W. A., Springer J. E. y Mattson M. P. (1999) ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp. Neurol.* 160, 28-39.
- Kwak S. y Nakamura R. (1995a) Selective degeneration of inhibitory interneurons in the rat spinal cord induced by intrathecal infusion of acromelic acid. *Brain Res.* 702, 61-71.
- Kwak S. y Nakamura R. (1995b) Acute and late neurotoxicity in the rat spinal cord in vivo induced by glutamate receptor agonists. *J. Neurol. Sci.* 129 Suppl, 99-103.
- Liochev S. I. y Fridovich I. (2000) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. *J. Biol. Chem.* 275, 38482-38485.
- Liu S., Ruenes G. L. y Yezierski R. P. (1997) NMDA and non-NMDA receptor antagonists protect against excitotoxic injury in the rat spinal cord. *Brain Res.* 756, 160-167.
- Lucas D. R. y Newhouse J. P. (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch. Ophthalmol.* 58, 193-201.
- Lundh H. (1978) Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. *Brain Res.* 153, 307-318.
- Manfredi G. y Xu Z. (2005) Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion* 5, 77-87.
- Maus M., Marin P., Israel M., Glowinski J. y Premont J. (1999) Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3215-3224.
- McCollum A. T., Jafarifar F., Lynn B. C., et al. (2006) Inhibition of calpain-mediated cell death by a novel peptide inhibitor. *Exp. Neurol.* 202, 506-513.
- Melloni E., Michetti M., Salamino F. y Pontremoli S. (1998a) Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for mu-isoforms. *J. Biol. Chem.* 273, 12827-12831.

- Melloni E., Michetti M., Salamino F., Sparatore B. y Pontremoli S. (1998b) Mechanism of action of a new component of the Ca^{2+} -dependent proteolytic system in rat brain: the calpain activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 583-588.
- Menzies F. M., Ince P. G. y Shaw P. J. (2002) Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem. Int.* 40, 543-551.
- Molinari M., Anagli J. y Carafoli E. (1994) Ca^{2+} -activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J. Biol. Chem.* 269, 27992-27995.
- Morales-Villagrán A. y Tapia R. (1996) Preferential stimulation of glutamate release by 4-aminopyridine in rat striatum in vivo. *Neurochem. Int.* 28, 35-40.
- Morrison B. M. y Morrison J. H. (1999) Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in superoxide dismutase: a putative mechanism of degeneration. *Brain Res. Rev.* 29, 121-135.
- Nagai M., Aoki M., Miyoshi I., 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.
- Nakamura R., Kamakura K. y Kwak S. (1994) Late-onset selective neuronal damage in the rat spinal cord induced by continuous intrathecal administration of AMPA. *Brain Res.* 654, 279-285.
- Nakanishi S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258, 597-603.
- Nicholls D. G. y Budd S. L. (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* 80, 315-360.
- Nishimura A. L., Mitne-Neto M., Silva H. C., et al. (2004) A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 822-831.
- Oda Y. (1999) Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol. Int.* 49, 921-937.
- Olanow C. W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 16, 439-444.
- Olney J. W. y Ho O. L. (1970) Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 227, 609-611.
- Olney J. W., Sharpe L. G. y Feigin R. D. (1972) Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 31, 464-488.
- Oosthuysen B., Moons L., Storkebaum E., et al. (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 28, 131-138.
- Palecek J., Lips M. B. y Keller B. U. (1999) Calcium dynamics and buffering in motoneurons of the mouse spinal cord. *J. Physiol.* 520 Pt 2, 485-502.
- Pardo C. A., Xu Z., Borchelt D. R., et al. (1995) Superoxide dismutase is an abundant component in cell bodies, dendrites, and axons of motor neurons and in a subset of other neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 954-958.
- Park J. H., Hong Y. H., Kim H. J., et al. (2007) Pyruvate slows disease progression in a G93A SOD1 mutant transgenic mouse model. *Neurosci. Lett.* 413, 265-269.
- Peña F. y Tapia R. (1999) Relationships among seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus: a microdialysis and electroencephalographic study. *J. Neurochem.* 72, 2006-2014.
- Peña F. y Tapia R. (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 101, 547-561.
- Petralia R. S., Rubio M. E., Wang Y. X. y Wenthold R. J. (2000) Regional and synaptic expression of ionotropic glutamate receptors. *Glutamate*, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. (Ottersen P. y Storm-Mathisen J., eds), pp 145-182. Elsevier Science, Amsterdam.
- Plaitakis A. (1990) Glutamate dysfunction and selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: a hypothesis. *Ann. Neurol.* 28, 3-8.

- Rami A. y Kriegstein J. (1993) Protective effects of calpain inhibitors against neuronal damage caused by cytotoxic hypoxia in vitro and ischemia in vivo. *Brain Res.* 609, 67-70.
- Rami A., Ferger D. y Kriegstein J. (1997) Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci. Res.* 27, 93-97.
- Ray S. K. y 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 CNS Neurol. Disord.* 2, 173-189.
- Reaume A. G., Elliott J. L., Hoffman E. K., et al. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13, 43-47.
- Rosen D. R., Siddique T., Patterson D., et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62.
- Rothstein J. D. y Kuncl R. W. (1995) Neuroprotective strategies in a model of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity. *J. Neurochem.* 65, 643-651.
- Rothstein J. D., Martin L. J. y 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., Jin L., Dykes-Hoberg M. y 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., Van Kammen M., Levey A. I., Martin L. J. y Kuncl R. W. (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38, 73-84.
- Rothstein J. D., Tsai G., Kuncl R. W., et al. (1990) Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 28, 18-25.
- Rothstein J. D., Dykes-Hoberg M., Pardo C. A., et al. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16, 675-686.
- Saido T. C., Mizuno K. y Suzuki K. (1991) Proteolysis of protein kinase C by calpain: effect of acidic phospholipids. *Biomed. Biochim. Acta* 50, 485-489.
- Schechter L. E. (1997) The potassium channel blockers 4-aminopyridine and tetraethylammonium increase the spontaneous basal release of [³H]5-hydroxytryptamine in rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 262-270.
- Schumacher P. A., Siman R. G. y Fehlings M. G. (2000) Pretreatment with calpain inhibitor CEP-4143 inhibits calpain I activation and cytoskeletal degradation, improves neurological function, and enhances axonal survival after traumatic spinal cord injury. *J. Neurochem.* 74, 1646-1655.
- Shaw P. J., Forrest V., Ince P. G., Richardson J. P. y Wastell H. J. (1995) CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 4, 209-216.
- Shaw P. J., Williams T. L., Slade J. Y., Eggett C. J. y Ince P. G. (1999) Low expression of GluR2 AMPA receptor subunit protein by human motor neurons. *Neuroreport* 10, 261-265.
- Siesjo B. K. (1994) Calcium-mediated processes in neuronal degeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 747, 140-161.
- Siklos L., Engelhardt J., Harati Y., et al. (1996) Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 39, 203-216.
- Spreux-Varoquaux O., Bensimon G., Lacomblez L., et al. (2002) Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J. Neurol. Sci.* 193, 73-78.
- Sullivan P. G., Rabchevsky A. G., Waldmeier P. C. y Springer J. E. (2005) Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J. Neurosci. Res.* 79, 231-239.
- Swerdlow R. H., Parks J. K., Cassarino D. S., et al. (1998) Mitochondria in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 153, 135-142.
- Tapia R. y Sitges M. (1982) Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Res.* 250, 291-299.

- Tapia R., Sitges M. y Morales E. (1985) Mechanism of the calcium-dependent stimulation of transmitter release by 4-aminopyridine in synaptosomes. *Brain Res.* 361, 373-382.
- Terro F., Yardin C., Esclaire F., Ayer-Lelievre C. y Hugon J. (1998) Mild kainate toxicity produces selective motoneuron death with marked activation of Ca²⁺-permeable AMPA/kainate receptors. *Brain Res.* 809, 319-324.
- Thesleff S. (1980) Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5, 1413-1419.
- Tomiyama M., Rodriguez-Puertas R., Cortes R., et al. (1996) Differential regional distribution of AMPA receptor subunit messenger RNAs in the human spinal cord as visualized by in situ hybridization. *Neuroscience* 75, 901-915.
- Tovar-y-Romo L. B. y 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.
- Tsien R. Y. (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290, 527-528.
- Van Den Bosch L. y Robberecht W. (2000) Different receptors mediate motor neuron death induced by short and long exposures to excitotoxicity. *Brain Res. Bull.* 53, 383-388.
- Van Den Bosch L., Vandenberghe W., Klaassen H., Van Houtte E. y Robberecht W. (2000) Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J. Neurol. Sci.* 180, 29-34.
- Vandenberghe W., Ihle E. C., Patneau D. K., Robberecht W. y Brorson J. R. (2000) AMPA receptor current density, not desensitization, predicts selective motoneuron vulnerability. *J. Neurosci.* 20, 7158-7166.
- Virgo L., Samarasinghe S. y de Belleruche J. (1996) Analysis of AMPA receptor subunit mRNA expression in control and ALS spinal cord. *Neuroreport* 7, 2507-2511.
- von Lewinski F. y Keller B. U. (2005) Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci.* 28, 494-500.
- Wang K. K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23, 20-26.
- Wang K. K., Nath R., Posner A., et al. (1996) An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6687-6692.
- Williams T. L., Day N. C., Ince P. G., Kamboj R. K. y Shaw P. J. (1997) Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 42, 200-207.
- Wisden W., Seeburg P. H. y Monyer H. (2000) AMPA, kainate and NMDA ionotropic glutamate receptor expression - an in situ hybridization atlas. *Glutamate*, in *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. (Ottersen P. y Storm-Mathisen J., eds), pp 99-143. Elsevier Science, Amsterdam.
- Yang Y., Hentati A., Deng H. X., et al. (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* 29, 160-165.
- Yin H. Z., Sensi S. L., Ogoshi F. y Weiss J. H. (2002) Blockade of Ca²⁺-permeable AMPA/kainate channels decreases oxygen-glucose deprivation-induced Zn²⁺ accumulation and neuronal loss in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 22, 1273-1279.
- Zhang W., Narayanan M. y Friedlander R. M. (2003) Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. *Ann. Neurol.* 53, 267-270.
- Zhu S., Stavrovskaya I. G., Drozda M., et al. (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* 417, 74-78.