

**Estudio del efecto neuroprotector de tratamientos farmacológicos en un modelo *in vitro* de lesión excitotóxica de médula espinal de rata basado en cultivos organotípicos**

**Mónica Sofía Guzmán Lenis**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por:

Caty Casas Louzao

Xavier Navarro Acebes

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia

Facultat de Medicina

2008

**UAB**  
Universitat Autònoma  
de Barcelona



**Estudio del efecto neuroprotector de tratamientos farmacológicos en un modelo *in vitro* de lesión excitotóxica de médula espinal de rata basado en cultivos organotípicos**

Memoria de Tesis doctoral presentada por **Mónica Sófía Guzmán Lenis** para optar al grado de Doctora en Neurociencias por la Universitat Autònoma de Barcelona. Realizada bajo la dirección de la Dra. **Caty Casas Louzao** y el Dr. **Xavier Navarro Acebes**.

Doctoranda

Directora de Tesis

---

Mónica Sofía Guzmán Lenis

---

Dra. Caty Casas Louzao

Director de Tesis

---

Dr. Xavier Navarro Acebes



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al grupo de Neuroplasticidad y Regeneración del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia de la UAB, en cuyo laboratorio llevé a cabo este trabajo. Mención especial merecen los profesores Xavier Navarro y Caty Casas. Su guía, experiencia y apoyo durante estos años en Barcelona fueron determinantes para llevar a buen termino mi investigación.



## ABREVIATURAS

AMPA <sub>r</sub>	Receptor AMPA
AMP <sub>c</sub>	Adenosín monofosfato cíclico
Bcl-2	Linfoma de células basales-2
Bcl-xL	Linfoma de células basales extra largo
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CREB	Elemento de unión en respuesta al AMP <sub>c</sub>
DAG	Diacilglicerol
DRG	Ganglio de la raíz dorsal
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EPO	Eritropoyetina
EPOR	Receptor de Eritropoyetina
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares
EthD	Homodímero de etidio
FKBP	Proteína de unión a FK506
GAP-43	Proteína asociada al crecimiento 43
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GR	Receptor de glucocorticoides
Grp78	Proteína regulada por glucosa
GSK3	Quinasa de la glicógeno sintasa 3
H3	Histona 3
HDAC	Deacetilasa de histonas
Hsp70/90	Proteína de choque térmico de 70 kDa/ 90 kDa
IL-1 $\beta$ /6	Interleukina 1 $\beta$ /6
IP3	Inositol trifosfato
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MAP1B	Proteína asociada a microtúbulos 1B
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK1/2	Quinasa de Proteín quinasas activadas por mitógenos
MN	Motoneurona
MP	Metílprednisolona
NASCIS	Estudio nacional de lesiones agudas de la médula espinal
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B

NGF	Factor de crecimiento nervioso
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAr	Receptor NMDA
NO	Óxido nítrico
NT-4	Neurotrofina 4
p75 NTR	Receptor de neurotrofinas p75
p90RSK	Quinasa ribosomal S6 de 90 kDa
PDE4	Fosfodiesterasa tipo 4
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PKC	Proteín quinasa C
PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
Ril	Riluzol
Rol	Rolipram
Sig1R/2R	Receptor sigma 1/2
SNC	Sistema nervioso central
TeTx-Hc	Región c terminal de la cadena pesada de la toxína tetánica
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
Trk A/B	Receptor tirosín-quinasa A/B
VP	Valproato



## RESUMEN

En la presente tesis doctoral se ha establecido y caracterizado un modelo *in vitro* de lesión excitotóxica por glutamato basado en cultivos organotípicos de médula espinal de rata postnatal de 7-8 días. La optimización del medio de cultivo sin suero permite mantener los explantes más de 15 días *in vitro* con unas características en cuanto a la citoarquitectura y al número de motoneuronas similares a las obtenidas con medio con suero. Sobre los explantes se han establecido dos modelos de lesión; una mecánica y otra excitotóxica. Para establecer la lesión excitotóxica se han utilizado diferentes concentraciones de glutamato que provocan una respuesta dependiente de dosis. Esta respuesta se ha evaluado cuantificando la cantidad de homodímero-1 de etidio, un marcador fluorescente que es captado por las células dañadas, mediante el análisis de imágenes y cuantificando el número de motoneuronas supervivientes. Asimismo, se ha caracterizado que esta lesión está mediada principalmente por el receptor de glutamato NMDA. Las motoneuronas en desarrollo postnatal sufren un cambio en las subunidades NR2A y NR3B el cual se mimetiza en los explantes organotípicos en nuestras condiciones de cultivo. Una vez estandarizado el modelo de lesión excitotóxica se ha utilizado para evaluar el efecto neuroprotector de diversos fármacos como son la eritropoyetina, el riluzol, el rolipram, el valproato, la región c terminal de la toxina tetánica y la metilprednisolona (ver Trabajo I). Este modelo ha sido de utilidad asimismo para analizar los mecanismos moleculares de algunos de estos fármacos como el FK506 y el ligando PRE084 del receptor sigma 1. El análisis ha permitido establecer que el FK506 preserva el parénquima tisular frente a la lesión, efecto que es favorecido por la modulación de los niveles de la chaperona Hsp70 que el FK506 produce sobre la microglia (ver Trabajo II). Por último, se ha podido observar que el PRE084 ejerce un efecto neuroprotector e inductor de la elongación neurítica en las motoneuronas del explante, y que dichos efectos son mediados por la PKC aunque no por la activación de CREB (ver Trabajo III).



# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. La médula espinal.....	3
2. Excitotoxicidad en la médula espinal.....	8
3. Lesiones que afectan la médula espinal.....	13
3.1. Lesión traumática de la médula espinal.....	14
3.2. Enfermedades neurodegenerativas que afectan la médula espinal.....	19
3.2.1. Enfermedades neurodegenerativas agudas.....	19
3.2.2. Enfermedades neurodegenerativas crónicas.....	20
3.2.3. Enfermedades Neurodegenerativas inflamatorias.....	21
4. Modelos de excitotoxicidad <i>in vitro</i> .....	22
5. Estrategias farmacológicas de neuroprotección de la médula espinal.....	25
5.1.1. Esteroides.....	27
5.1.2. Ligandos de Inmunofilinas.....	32
5.1.3. Bloqueadores de canales de sodio.....	32
5.1.4. Eritropoyetina.....	33
5.1.5. Agentes dirigido al AMPc.....	34
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
RESULTADOS.....	47
Trabajo I	
Establecimiento y caracterización de un modelo <i>in vitro</i> de lesión excitotóxica de la médula espinal para el rastreo de fármacos neuroprotectores.....	49
<i>Artículo I</i> : Drug screening of neuroprotective agents on an organotypic-based model of spinal cord excitotoxic damage.....	53
<i>Anexo I</i> : Modelo <i>in vitro</i> de lesión por contusión en organotípicos de médula espinal de rata.....	90
<i>Anexo II</i> : Cambios en el receptor NMDA durante la maduración <i>in vitro</i> de los cultivos organotípicos de médula espinal.....	92
<i>Anexo III</i> : Efecto de la aplicación del fragmento c terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (TeTx-Hc) en un modelo <i>in vitro</i> de lesión excitotóxica por glutamato basado en cultivos organotípicos de médula espinal de rata.....	94
<i>Anexo IV</i> : Ensayo del valproato como agente neuroprotector en explantes de médula espinal sometidos a una lesión excitotóxica.....	96

Trabajo II

Análisis del efecto neuroprotector del FK506 ..... 99

*Artículo 2: Analysis of FK506-mediated protection in an organotypic model of spinal cord damage: Heat shock protein 70 levels are modulated in microglial cells..... 101*

Trabajo III

Análisis del efecto neuroprotector y neuritogénico de PRE084, agonista del receptor ..... 113

*Artículo 3: Selective Sigma Receptor Agonist PRE084 Promotes Neuroprotection and Neurite Elongation Through PKC Signaling on Motoneurons ..... 117*

*Anexo V: Variación de la viabilidad celular de los cultivos de ganglios de la raíz dorsal tratados con PRE084, BD1063 y chelerythrine. .... 140*

*Anexo VI: Cambios en la expresión del receptor sigma-1 en organotípicos de médula espinal ..... 141*

*Anexo VII: Los niveles de pCREB en explantes de ganglio de la raíz dorsal, y cultivos organotípicos de médula espinal no varían con el tratamiento de PRE084 ..... 142*

DISCUSIÓN ..... 145

Cultivo organotípico de médula espinal ..... 147

Modelos de lesión ..... 150

Agentes neuroprotectores ..... 153

CONCLUSIONES ..... 173

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 177

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. La médula espinal

La médula espinal es la vía principal de flujo de información entre el cerebro y el sistema nervioso periférico. La médula espinal se encuentra envuelta por tres capas de tejido conectivo, las meninges raquídeas, que de la más externa a la interna son, la duramadre, la aracnoides y la piamadre. Entre la aracnoides y la duramadre se halla el espacio subdural y entre la piamadre y la aracnoides, el subaracnoideo. Es éste último el que contiene el líquido cefalorraquídeo. En la cuerda raquídea se aprecian dos engrosamientos, el cervical y el lumbar, ambos coincidiendo con el emplazamiento de los nervios de las extremidades.

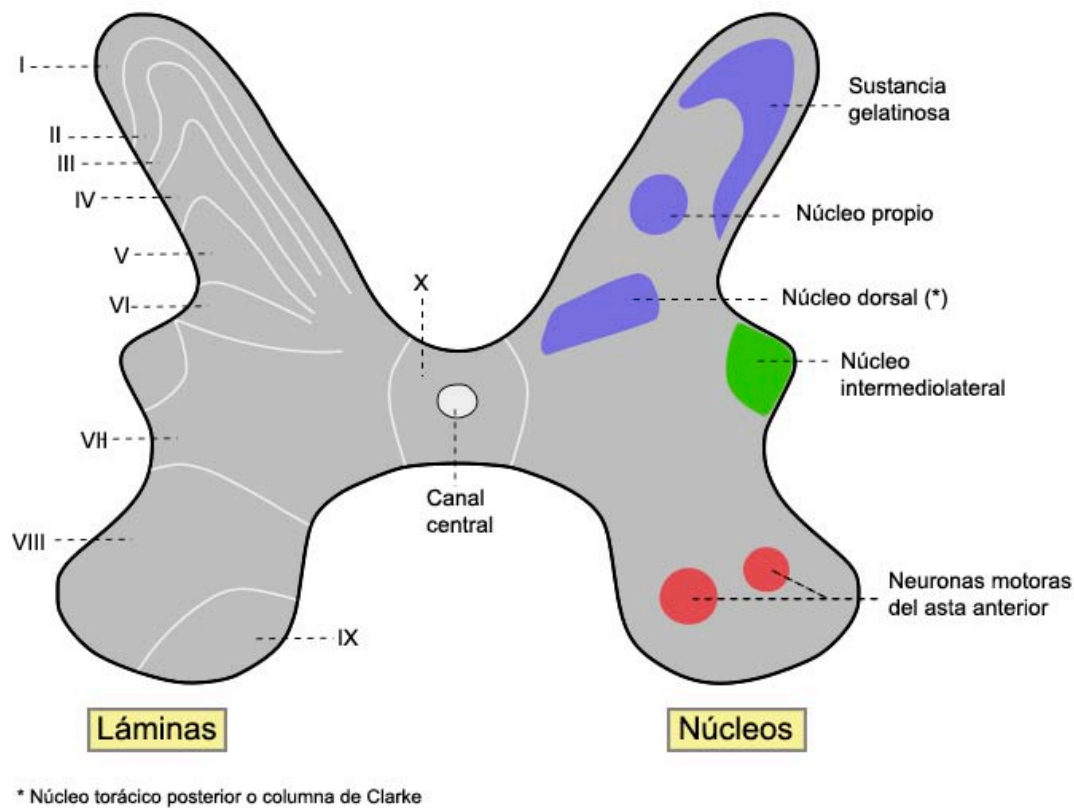
La organización de la médula espinal tiene apariencia segmentada debido a los pares de nervios espinales que salen de ella a intervalos regulares y cuya nomenclatura, al igual que la de los segmentos espinales, depende de su localización.

Cada nervio espinal se conecta con un segmento de la médula espinal mediante dos haces de axones llamados raíces. La raíz dorsal o posterior contiene fibras sensoriales y la raíz anterior o ventral, las fibras motoras. Cada una de las raíces posteriores tiene un engrosamiento, el ganglio de la raíz dorsal, en donde se encuentran los cuerpos de las neuronas sensoriales.

La sustancia gris medular está subdividida en asta anterior o ventral y en asta posterior o dorsal, y cada una de estas contiene cúmulos de cuerpos neuronales que constituye grupos que somatotópicamente está subdivididos en 10 láminas denominadas láminas de Rexed. Las seis primeras láminas hacen parte del asta posterior, mientras que las láminas VII a IX son parte del asta anterior.

La **lámina I** o núcleo posteromarginal da origen a la vía que lleva información sobre dolor y estímulos térmicos al tálamo. Las **láminas II y III** o sustancia gelatinosa, regulan la entrada aferente a la médula espinal. La lámina II también reciben información del fascículo descendente dorsolateral y envía axones a la lámina de Rexed III y IV. Altas concentraciones de sustancia P y de receptores opiáceos han sido identificados en ésta lámina. La lámina III está compuesta de células de tamaño variable y reciben sinapsis axodendríticas de las fibras A $\beta$  procedentes de la raíz dorsal. Además contiene dendritas de las láminas IV, V y VI. Las neuronas de esta lámina funcionan como células propioespinales/interneuronas. La **lámina IV** o núcleo propio, recibe axones A $\beta$ , proyecta a la lámina II y responde a estímulos de tacto. Algunas células proyectan al tálamo vía tracto espinotalámico contralateral e ipsilateral. La **lámina V** está compuesta por neuronas cuyas dendritas se encuentran en la lámina II. Las neuronas de esta lámina reciben

información monosináptica de axones A $\beta$  y C, los cuales traen información nociceptiva de órganos viscerales. Además las células de esta lámina se proyectan al tronco del encéfalo y al tálamo vía tracto espinotalámico contralateral e ipsilateral. Además, fibras descendentes corticoespinales y rubroespinales hacen sinapsis aquí. La **lámina VI** es una lámina amplia que se encuentra mejor desarrollada en los engrosamientos cervical y lumbar. Esta lámina se encuentra dividida en dos regiones, una medial y otra lateral. Los axones aferentes provenientes de los husos musculares terminan en la parte medial de la lámina, entre los niveles segmentales C8 a L3, y son el origen de las vías espinocerebrales ipsilaterales. En la zona lateral de la lámina proyectan las vías descendentes del tronco del encéfalo. Muchas de las neuronas pequeñas que se observan en la lámina, son interneuronas que participan en los reflejos espinales.



**Figura 1.** Esquema de la sustancia gris de la médula espinal mostrando su subdivisión en láminas de Rexed y núcleos.

La **lámina VII** ocupa una región amplia y heterogénea y es conocida como la zona intermedia o núcleo intermedio lateral. Su forma y límites varían a lo largo de la médula

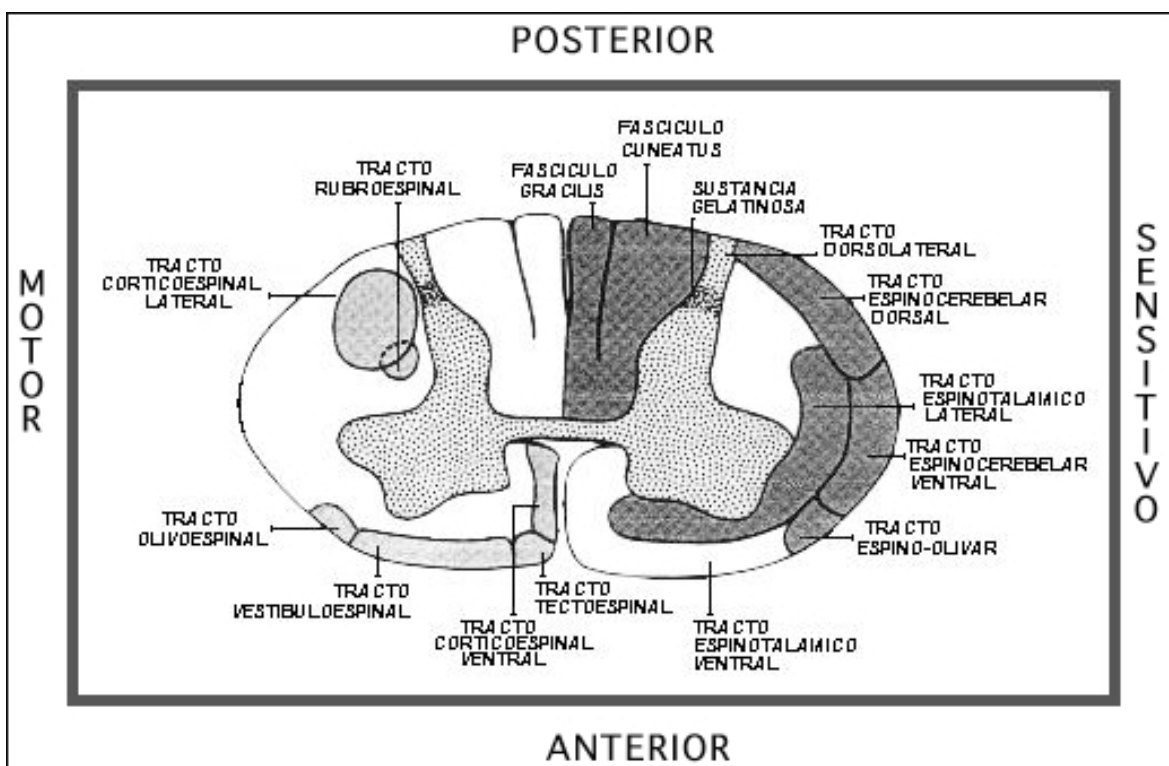


espinal. Las neuronas de esta lámina reciben información de las láminas II a VI al igual que de las fibras viscerales aferentes. Estas neuronas sirven como relevo intermedio en la transmisión de impulsos de motoneuronas viscerales. El núcleo dorsal de Clarke forma una prominente columna oval de células desde C8 hasta L3. Sus grandes células dan origen a fibras nerviosas no cruzadas del tracto espinocerebeloso y células en las láminas V a VII, las cuales no forman un núcleo discreto, dan origen al tracto espinocerebeloso ventral. Células en el asta lateral de la médula en los segmentos T1 a L3 dan origen a fibras preganglionares simpáticas al igual que las de los segmentos S2 a S4. La **lámina VIII** incluye un área en la base del asta ventral que varía de forma a lo largo de la médula espinal. En los engrosamientos de la médula, la lámina ocupa sólo la parte medial del asta ventral y es ahí donde terminan las fibras descendentes vestibuloespinales y reticuloespinales. Las neuronas de esta lámina modulan la actividad motora vía motoneuronas gamma, las cuales inervan las fibras intrafusales musculares. La **lámina IX**, contiene varios grupos de grandes motoneuronas alfa y pequeñas motoneuronas gamma y beta. El tamaño y la forma de esta lámina difiere a varios niveles espinales. En los engrosamientos de la médula, el número de motoneuronas alfa aumenta. Estas motoneuronas alfa son células grandes multipolares que dan origen a fibras de las raíces ventrales que inervan las fibras extrafusales del músculo esquelético, mientras que las pequeñas motoneuronas gamma inervan las fibras intrafusales. Las motoneuronas se encuentran organizadas somatotópicamente. Finalmente, la **lámina X** se encuentra alrededor del canal central y contiene neuronas que proyectan al lado opuesto de la médula (Brichta y Grant, 1985; Dafny, 2008; Felten y Józefowicz, 2003).

Al igual que la sustancia gris, la sustancia blanca está organizada en regiones: Columnas anteriores, columnas posteriores y las laterales. A su vez cada cordón consta de distintos haces de axones o fascículos. Los hay de dos tipos, los sensoriales o ascendentes, y los motores o descendentes.

Las fibras nerviosas que conforman los fascículos ascendentes emergen de las neuronas de primer orden localizadas en el ganglio de la raíz dorsal. Los tractos ascendentes transmiten información sensorial desde de los receptores sensoriales hasta niveles superiores del sistema nervioso central (SNC). Los fascículos ascendentes grácil y cuneado ocupan la columna dorsal (llamados funículo dorsal). Estas fibras llevan información relacionada a tacto, discriminación entre dos puntos, vibración, posición y sentido de movimiento consciente. En la columna lateral, el tracto espinotalámico lateral está localizado de forma anterolateral. Éste lleva información de dolor, temperatura y tacto grosero de estructuras

somáticas y viscerales. Cercanos y laterales a éste están el tracto espinocerebeloso dorsal y el ventral que llevan información de propiocepción inconsciente procedente de músculos y articulaciones al cerebelo. En la columna ventral hay cuatro tractos prominentes: el tracto espinotalámico anterior, que lleva dolor, temperatura e información relacionada con tacto a los núcleos del tronco del encéfalo y diencefalo; el tracto espinoolivario, que lleva información de los organos de Golgi al cerebelo; el tracto espinoreticular y el espinotectal. Fibras intersegmentales que viajan por varios segmentos (2 a 4) y que están localizadas a modo de capa delgada alrededor de la materia gris son conocidas como fascículo propio o tracto espinoespinal. Éste lleva información de dolor al tronco del encéfalo y diencefalo.



**Figura 2.** Localización de los fascículos sensoriales y motores como se aprecian en un corte transversal de médula espinal.

Los tractos descendentes se originan en diferentes áreas corticales y en los núcleos del tronco del encéfalo. Las vías descendentes llevan información asociada a el mantenimiento de las actividades motoras, tales como postura, balance, tono muscular y visceral, y reflejos somáticos. Estos incluyen los tractos corticoespinal y rubroespinal, localizados en el funículo lateral, en el humano. El tracto corticoespinal en ratas se encuentra localizado en el funículo dorsal, siendo ésta la única diferencia existente entre la localización de los

tractos espinales en hombres y ratas (Schwartz et al., 2005). Estos tractos llevan información asociada al movimiento voluntario. Otros tractos como el reticuloespinal, vestibuloespinal y el tracto corticoespinal anterior median balance y movimientos posturales. El tracto de Lissauer, el cual está entre el asta dorsal y la superficie de la médula espinal, lleva fibras descendentes del funículo dorsolateral, el cual regula las sensaciones entrantes de dolor a nivel espinal, y las fibras intersegmentales (Dafny, 2008; Felten y Józefowicz, 2003; Tracey, 1985).

Como ya hemos mencionado, las motoneuronas se encuentran en el asta ventral de la materia gris, estas van innervando diferentes músculos tanto axiales como de las extremidades. A nivel cervical, las motoneuronas ventrales innervan las extremidades delanteras (C4-T1) (Harada, 1996) y se ha visto que la lesión a nivel de C7 causa una pérdida permanente de la extensión del codo y una lesión a nivel de C4-C5 produce una hipometría en la extensión de la pata delantera que lleva, en ratas, a un déficit crónico en la tarea de alcance debido a la falta de elevación de la pata y flexión del hombro (Collazos-Castro et al., 2005). Motoneuronas ventrales a nivel torácico innervan tanto los músculos intercostales (T1-T13) como los abdominales (T5-L3), siendo importantes para la función respiratoria, su pérdida causa alteraciones significativas en las propiedades elásticas de los pulmones y reducen la de la caja torácica (Teng et al., 1999). A nivel lumbar se encuentran las motoneuronas encargadas de la innervación de la musculatura de las extremidades posteriores, una lesión a nivel de L2, donde se encuentran la mayoría de las motoneuronas que innervan músculos extensores de la rodilla, causa disminución en la extensión de la extremidad trasera (Collazos-Castro et al., 2005) y, como en estos segmentos lumbares anteriores se encuentra el centro generador del patrón de locomoción (lumbares medios en gatos) (Rossignol et al., 2004), la pérdida de éstas neuronas también causa un grave disfunción locomotriz que es difícilmente recuperable con terapias restaurativas (García-Alias et al., 2006). En definitiva, la pérdida de las motoneuronas contribuye al déficit motor (Collazos-Castro et al., 2005) y se encuentra asociada al déficit permanente de la locomoción que se observa después de una lesión de médula espinal. Por ello, el rescate de las motoneuronas es un importante pre-requisito para alcanzar la recuperación funcional (Nakajima et al., 2007).

## 2. Excitotoxicidad en la médula espinal

Una condición patológica que parece ser común a una variedad de trastornos neurológicos es la excitotoxicidad (Leist y Nicotera, 1998). Este término describe el proceso de muerte neuronal causado por la excesiva o prolongada activación de los receptores de **aminoácidos excitadores**. Esta clase de aminoácidos incluye al ácido glutámico y a otro aminoácido constitutivo, el ácido aspártico, así como componentes exógenos de origen natural (ácidos quisquálico, kaínico y domoico) o sintético (NMDA).

El ácido glutámico es, en mamíferos, el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC, siendo responsable de al menos un tercio de todas las sinapsis excitadoras rápidas (Cotman y Monaghan, 1986; Watkins y Evans, 1981).

Las principales vías de entrada y salida de información del cerebro usan ácido glutámico como neurotransmisor, como lo hacen numerosos circuitos locales en el cortex, hipocampo, cerebelo y muchas otras regiones cerebrales (Cotman y Monaghan, 1986). Se presume que el ácido glutámico es el neurotransmisor de las proyecciones de fibras sensoriales que proyectan a la médula espinal y al núcleo trigeminal, y del tracto espinocerebeloso. También media la salida centrífuga motora de centros superiores del córtex a los ganglios basales, médula espinal y tálamo; de los ganglios basales al tálamo y desde el mesencéfalo al cerebelo.

Es importante para el funcionamiento normal de estas sinapsis que la acción excitadora del ácido glutámico sea rápidamente terminada, por lo que se cuenta con un eficiente sistema de recaptación del ácido glutámico en células gliales y terminales nerviosas (Nicholls y Attwell, 1990). Esta función es asegurada por transportadores específicos que permiten el transporte conjunto de ácido glutámico con iones de sodio y, concomitantemente, contra-transporte de iones potasio usando el gradiente electroquímico de membrana para el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$  como la fuerza conductora. Este proceso es altamente eficiente y permite que el ácido glutámico esté 10000 veces más concentrado en el compartimiento intracelular con respecto al medio extracelular.

Elevados niveles extracelulares de ácido glutámico causan una despolarización persistente de la neurona, disparando una cascada de eventos celulares que eventualmente llevan a la muerte celular. Tres elementos de esta cascada pueden ser identificados: dependientes de la entrada de  $\text{Na}^+$ , dependientes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y los que dependen de la exocitosis del ácido glutámico. Estos tres elementos no son independientes y pueden ocurrir en paralelo. Al parecer la entrada de  $\text{Na}^+$  es responsable de los eventos necróticos tempranos, la de  $\text{Ca}^{2+}$

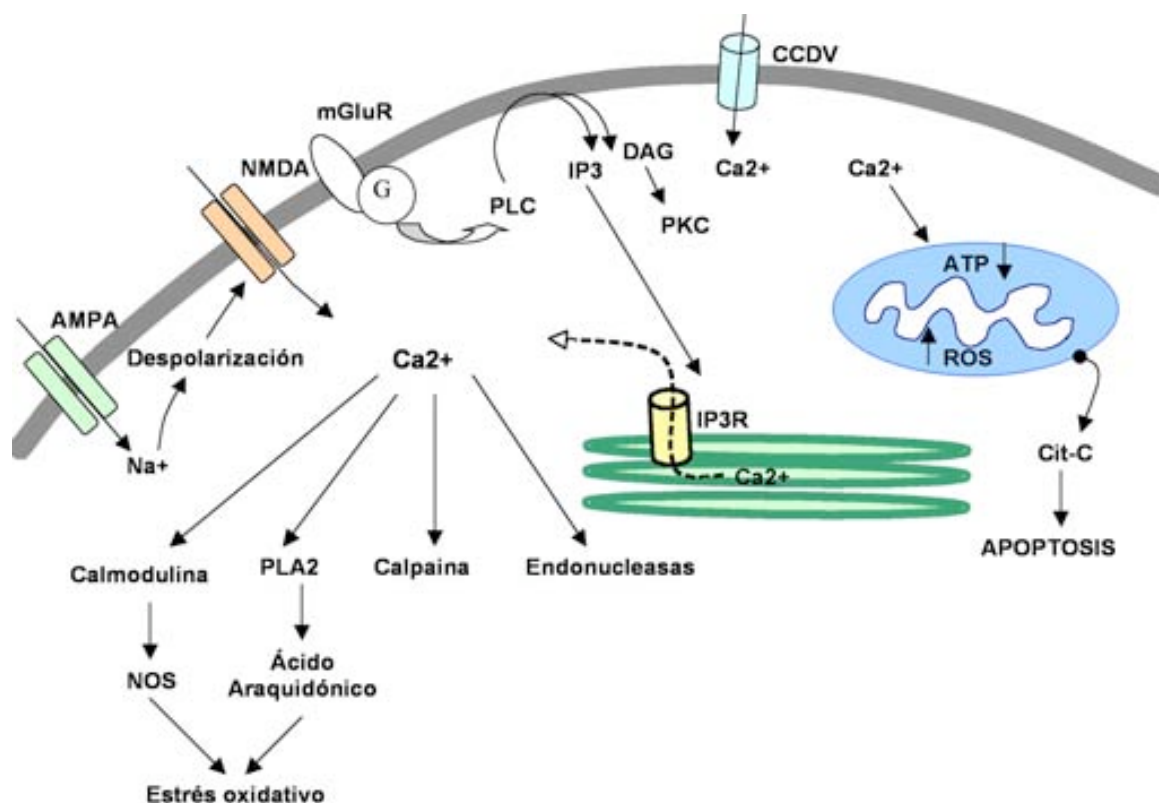
de los eventos degenerativos subsecuentes y la exocitosis de ácido glutámico de la amplificación de los procesos degenerativos.

La despolarización es básicamente iniciada por la activación de los receptores AMPA y seguida por la activación de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, que lleva a una entrada de  $\text{Na}^+$  y la subsecuente despolarización. Si la célula se mantiene crónicamente despolarizada, el receptor NMDA retira el magnesio que lo bloquea y se torna disponible para activación por el glutamato sináptico, siendo su activación la mayor fuente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula.

El aumento de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , gracias a la persistente despolarización, altera el balance osmótico (Kiedrowski et al., 1994), debido a que la entrada de iones sodio es seguida, en busca del equilibrio iónico, por una entrada pasiva de iones cloro (Rothman, 1985) y a su vez, ésta promueve la entrada de agua a favor de gradiente osmótico. La consecuencia final de este hinchamiento osmótico es la lisis celular y la liberación de los contenidos celulares al medio extracelular. El componente osmótico de la excitotoxicidad es potencialmente reversible si el estímulo despolarizante es eliminado, aunque si el insulto es lo suficientemente intenso no evitará la subsiguiente muerte celular, ya que éste no es un paso obligado en la vía (Choi, 1987a).

La parte dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de la cascada excitotóxica parece ser la esencial para la toxicidad. Los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se mantienen usualmente muy bajos ( $\sim 10^{-7}$  M), pero cuando la célula es excesivamente despolarizada, su concentración aumenta persistentemente. La principal fuente intracelular de calcio iónico durante la despolarización neuronal es la entrada a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y, en presencia de ácido glutámico extracelular, la apertura de canales del receptor NMDA, cuyo bloqueo por magnesio es eliminado en la despolarización (Koch y Barish, 1994). Stys y colaboradores mostraron que hay una liberación adicional de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente de receptores  $\text{IP}_3$  (Stys, 2005), vía activación de la fofolipasa C por receptores metabotrópicos de glutamato (específicamente mGluR-I). Además, se ha demostrado la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares vía activación de los receptores NMDA (Frandsen y Schousboe, 1992; Lei et al., 1992; Sattler y Tymianski, 2000).

El aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la actividad de múltiples enzimas y dispara otras interacciones proteína-proteína dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que son dañinas para la homeostasis celular, tales como: activación de nucleasas que interrumpen la organización de la cromatina en el núcleo y fragmentan el ADN (Orrenius et al., 1989); activación de proteasas citosólicas como la calpaina, que atacan el citoesqueleto y otros organelos (Mills



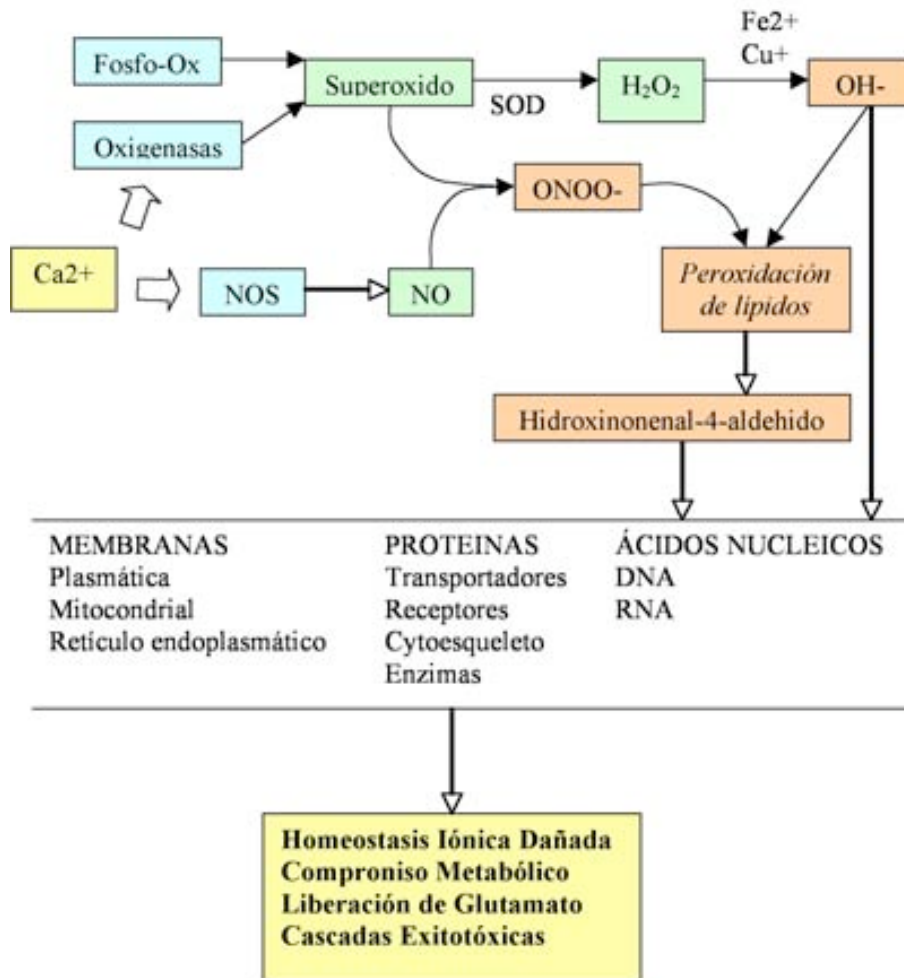
**Figura 3.** Dibujo esquemático de cascadas de señalización activadas por un incremento en el calcio intracelular por encima de los umbrales tóxicos. La unión de glutamato a receptores AMPA y kainato abre los canales del receptor produciendo un influjo de sodio ( $\text{Na}^+$ ), con la consecuente despolarización de la membrana y apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV). Algunas formas del receptor AMPA son también permeables al calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La unión de glutamato a receptores NMDA, resulta en una entrada de grandes cantidades de calcio. La activación de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) induce la activación de fosfolipasa C (PLC) y la consecuente producción de IP3 y diacil-glicerol (DAG). IP3 activa los receptores de IP3 (IP3R) de la membrana del retículo endoplasmático, resultando en la liberación de calcio del retículo endoplasmático al citosol. El incremento en los niveles citoplasmáticos de calcio puede provocar su entrada en la mitocondria, la cual reacciona a niveles excesivos mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inhibir la producción de ATP. Los niveles elevados de calcio también causan acumulación de ROS vía activación de la fosfolipasa-A2 (PLA2) y producción de ácido araquidónico; producción de óxido nítrico a través de la activación de la sintasa de óxido nítrico (NOS) por calmodulina y degradación de ácidos nucleicos y proteínas del citoesqueleto vía activación de endonucleasas y calpaina. Esta última también es responsable de la activación de caspasas (Harada S, 1996; Sattler y Tymianski, 2000).

y Kater, 1990; Siman et al., 1989); quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la PKC (proteín quinasa C), que modifican el estado de fosforilación de las proteínas citoplasmáticas y así

interrumpen las funciones celulares (Favaron et al., 1990); lipasas, como la fosfolipasa A<sub>2</sub>, que ataca la membrana celular y de organelos. Durante el curso de la excitotoxicidad la concentración de ácido glutámico en el medio extracelular aumenta. Las tres principales causas de esto son: liberación del ácido glutámico intracelular debida a lisis de las células, disminución o reversión de la recaptación de glutamato después de la despolarización, y exocitosis dependiente de Ca<sup>2+</sup> de vesículas sinápticas. La gran concentración de ácido glutámico presente en el ambiente extracelular del área original del insulto excitotóxico puede difundirse, despolarizando neuronas debilitadas y extendiendo la despolarización a neuronas no lesionadas en la vecindad.

Bajo ciertas circunstancias la activación de receptores no-NMDA también puede ser responsable de muerte neuronal, en procesos de excitotoxicidad lenta, como el que se ve al inhibir la recaptación de ácido glutámico (Rothstein et al., 1993). La excitotoxicidad lenta puede ocurrir sin necesidad de haber una alta concentración de ácido glutámico o excitotoxinas exógenas en el medio (Novelli et al., 1988; Zeevalk y Nicklas, 1990). Las neuronas se vuelven vulnerables a ácido glutámico del ambiente extracelular debido a un daño en el metabolismo energético de la célula, que afecta la función mitocondrial. Al caer los niveles de ATP, la actividad de las bombas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> disminuye y, como resultado, el potencial de membrana deriva hacia la despolarización lo que incrementa la probabilidad de apertura de canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje y la hace más propensa a disparar potenciales de acción en respuesta a estímulos excitadores (Riepe et al., 1995). La despolarización de la membrana celular levanta el bloqueo de magnesio del receptor de NMDA, lo que permite que el receptor sea activado por concentraciones sinápticas normales de ácido glutámico. Por otro lado, el aumento de la concentración intracelular de Na<sup>+</sup> atenúa el gradiente electroquímico del Na<sup>+</sup> a través de la membrana celular y de paso atenúa la fuerza que este genera y que es necesaria en una serie de procesos de transporte activo, como la recaptación de glutamato. El transporte de ácido glutámico se ve disminuido y potencialmente tiende a revertirse llevando a la secreción de ácido glutámico y a un aumento en las concentraciones extracelulares de éste (Gemba et al., 1994; Roettger y Lipton, 1996). El colapso del gradiente electroquímico de Na<sup>+</sup> unido a la caída intracelular de los niveles de ATP disminuye la actividad de los intercambiadores de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> responsables de la excreción de iones de calcio de la célula (Koch y Barish, 1994), produciendo un aumento en las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular que contribuyen a dañar la célula. Finalmente, la fuerza de conducción en la bomba de

protones, responsable de excretar protones de la célula, se ve reducida (Koch y Barish, 1994), lo que lleva a una acidificación del medio intracelular.



**Figura 4.** Papel del estrés oxidativo en la excitotoxicidad. La fosforilación oxidativa mitocondrial (Fosfo-Ox) es una fuente importante de superóxido. Éste también es producido por oxigenasas activadas por calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La acción de superóxido dismutasas de Mn y Cu/Zn (SOD), convierten el superóxido a peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{+}$ , es convertido a radical hidroxilo ( $\text{OH}^{-}$ ), que es un potente inductor de la peroxidación de lípidos. El calcio también promueve la producción de especies reactivas de oxígeno activando la sintasa de óxido nítrico (NOS). El óxido nítrico producido por esta reacción reacciona con el superóxido generando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{-}$ ), el cual es un potente inductor de la peroxidación de lípidos. La peroxidación de lípidos da origen a hidroxinonenal-4-aldehído, una sustancia citotóxica que afecta negativamente la función de las ATPasas iónicas de membrana y de los transportadores de glucosa y glutamato. Las especies reactivas de oxígeno, particularmente el radical hidroxilo y el peroxinitrito, también pueden dañar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, causando una disminución de la función de estas moléculas y ejecutando así el proceso excitotóxico. Figura modificada de Mattson (2003) (Mattson, 2003).



Se ha documentado que neuronas sometidas a un insulto excitotóxico presentan un estrés oxidativo aumentado, exhibiendo altos niveles de superóxido y peróxido de hidrógeno cuando son expuestas a ácido glutámico o NMDA (Blanc et al., 1998; Urushitani et al., 2001). El peróxido de hidrógeno puede ser convertido a radical hidroxilo al interactuar con  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Cu}^+$ , este radical es altamente reactivo y un potente inductor de peroxidación de lípidos. Microglía y algunas neuronas producen óxido nítrico en respuesta a la activación de los receptores de glutamato, éste puede reaccionar con el superóxido para producir peroxinitrito, el cual puede dañar membranas y proteínas (Zhao et al., 2004). Las especies reactivas de oxígeno también pueden dañar ácidos nucleicos, y consecuentemente menoscabar la expresión génica y disparar la apoptosis (Dawson y Dawson, 2004).

El estrés oxidativo también puede tornar a las neuronas más vulnerables a la excitotoxicidad. Estudios han demostrado que las neuronas son más fácilmente dañadas por el ácido glutámico cuando están bajo condiciones de estrés oxidativo aumentado (Comoletti et al., 2001; Mander et al., 2005; Urushitani et al., 1998; Zhao et al., 2004). El estrés oxidativo disminuye la función de proteínas clave envueltas en el mantenimiento del homeostasis celular de  $\text{Ca}^{2+}$ , como las ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$ ; y el transportador de glucosa (Mattson, 2003). Además el estrés oxidativo puede disminuir el transporte de glutamato en astrocitos (Barbeito et al., 2004; Blanc et al., 1998; Rao et al., 2003), esto promueve la excitotoxicidad como resultado de un incremento en las concentraciones extracelulares de ácido glutámico.

El rol crítico del estrés oxidativo en la excitotoxicidad ha sido demostrado en cultivos celulares y en modelos *in vivo* mediante la manipulación de la expresión de genes que están involucrados en la producción de especies reactivas de oxígeno (Ayata et al., 1997; Dawson et al., 1996; Keller et al., 1998).

### **3. Lesiones que afectan la médula espinal**

Las lesiones de la médula espinal pueden tener diferentes etiologías. La causa más frecuente es el traumatismo, originado por diversos medios como los accidentes de tráfico, deportivos o laborales. La lesión medular también puede ser causada por procesos degenerativos, infecciosos o inflamatorios, tales como esclerosis múltiple y mielitis, por procesos tumorales y por lesiones isquémicas medulares. Se calcula que más de 300.000 personas viven con lesiones medulares en los estados miembros del Consejo de Europa, con aproximadamente 11.000 casos nuevos todos los años. La incidencia de la lesión medular traumática en España es de aproximadamente 20 casos por cada millón de

habitantes y año (aproximadamente 1.000 personas al año). A estos datos se deben añadir las lesiones de origen médico, que representan aproximadamente un 25% adicional.

La lesión traumática de la médula espinal causa una pérdida de las funciones motoras, sensoriales y autonómicas por debajo del nivel de lesión, causando paraplejia o tetraplejia a los sujetos que las padecen. El déficit funcional ocasionado por la lesión medular depende del grado de afectación de las vías espinales y de las neuronas segmentales. En todo caso, el déficit provocado por la lesión medular se mantiene de por vida, ya que las capacidades endógenas de reparación y de regeneración en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos adultos son muy limitadas, lo que determina que las neuronas perdidas no se reemplacen y que las vías espinales afectadas queden interrumpidas indefinidamente. Los dos problemas fundamentales asociados con las lesiones de la médula espinal son la muerte neuronal secundaria y la formación en la zona de lesión de un microambiente inhibitorio de la regeneración axonal.

### 3.1. Lesión traumática de la médula espinal

La lesión traumática de la médula espinal es un proceso que comprende dos fases consecutivas en el tiempo, la fase de lesión primaria y la secundaria. La fase **primaria**, responsable inmediata de producir la lesión, se caracteriza por ser un proceso accidental, no modulable, y el daño que produce está directamente relacionado con la energía aplicada sobre la médula espinal en el momento del impacto (Kwon et al., 2004; Sekhon y Fehlings, 2001).

La lesión **secundaria** se produce de manera progresiva y comprende una cascada de procesos responsables de la expansión de la lesión traumática inicial y de la mayoría de las deficiencias funcionales resultantes. Los procesos secundarios que se observan tras una lesión en la médula espinal pueden ser clasificados *a grosso modo*, en aquellos que involucran los cambios vasculares producidos en la lesión aguda y que marcan el inicio de la lesión secundaria; las alteraciones en la homeostasis iónica, producidas por daños directos sobre las membranas celulares y alteraciones en el funcionamiento de bombas y canales iónicos; la producción de radicales libres, junto a la peroxidación de lípidos por estos; y finalmente, la muerte celular.

Los **cambios vasculares** producen trastornos en el flujo sanguíneo de la médula espinal que causan perturbaciones que juegan un papel importante en las alteraciones inducidas por la lesión aguda espinal. Los cambios del flujo sanguíneo pueden ser divididos en dos, sistémicos y locales. Los cambios locales, asociados a desarreglos microcirculatorios,

incluyen: hemorragia, vasoespasmo, trombosis y daños en la autorregulación. En los efectos sistémicos se incluye el choque neurogénico, como resultado de la pérdida del tono vasomotor (Tator y Fehlings, 1991; Tator, 1991).

Inmediatamente después de la lesión, ocurre una reducción considerable en el flujo sanguíneo en la zona lesionada (Bingham et al., 1975; Fehlings et al., 1989; Griffiths, 1976; Kobrine et al., 1975; Senter y Venes, 1978; Tator y Fehlings, 1991). Esta isquemia, si no es tratada, tiende a empeorar durante las primeras horas (Fehlings et al., 1989) y puede persistir al menos durante 24 h después de una lesión espinal en ratas y monos (Rivlin y Tator, 1978; Sandler y Tator, 1976). Los mecanismos precisos causantes de esta isquemia parecen implicar parcialmente el vasoespasmo secundario al daño mecánico o liberación de aminas vasoactivas (Tator y Fehlings, 1991), así como el daño endotelial (Dohrmann y Allen, 1975), las hemorragias (Wallace, Tator, y Frazee, 1986) o la trombosis, vía agregación plaquetar (de la Torre, 1981; Nemecek, 1978) y aminoácidos excitadores, particularmente el glutamato. La isquemia puede jugar un papel en la formación del edema local en la médula, aunque no está claro si la formación del edema es nociva en si misma o es un epifenómeno (Sekhon y Fehlings, 2001).

Debido a diferencias en vascularización relativa, la sustancia gris, al igual que la sustancia blanca adyacente, es más severamente afectada por una lesión de médula espinal que la sustancia blanca periférica (Sekhon y Fehlings, 2001; Tator y Koyanagi, 1997). En una situación normal el flujo sanguíneo de la sustancia gris con respecto a la sustancia blanca se mantiene en una razón 3:1 (Balentine, 1978a; Balentine, 1978b; Fairholm y Turnbull, 1970; Hayashi et al., 1983a; Hayashi et al., 1983b).

La perfusión en la sustancia blanca típicamente disminuye a los 5 minutos de producirse la lesión aguda y empieza a restablecerse a los 15 minutos, permaneciendo de ahí en adelante con valores cercanos a los normales pre-lesión durante las primeras 24 h. Con la sustancia gris ocurre lo contrario. En ésta, numerosas hemorragias ocurren a los 5 minutos después de la lesión y la perfusión se encuentra relativamente ausente 1 h después de la lesión, permaneciendo en este estado por al menos las primeras 24 h (Tator y Koyanagi, 1997). Este periodo estático de la vasculatura ha sido confirmado usando diferentes métodos (Dohrmann y Wick, 1973; Fried y Goodkin, 1971; Tator y Fehlings, 1991) y juega un papel importante en los resultados observados en la lesión aguda de la médula espinal. El proceso de reperfusión significa un incremento en los radicales libres derivados de oxígeno, lo que exacerba aún más el daño secundario (Basu et al., 2001; Lukacova et al., 1996).

Este daño endotelial ocurre de forma temprana, entre 1 y 2 horas después de haberse producido la lesión aguda (Demopoulos et al., 1982b), y en el se observa la formación de cráteres, adherencia de restos no celulares, apertura de las uniones entre células endoteliales y formaciones microglobulares. Estas alteraciones en las células endoteliales causan un incremento en la permeabilidad vascular y en la formación del edema (Griffiths y Miller, 1974; Hsu et al., 1985; Stewart y Wagner, 1979), además, el daño mecánico primario causa la ruptura de la barrera hemato-medular lo que resulta en una invasión inflamatoria de neutrófilos, macrófagos y células T (Bareyre y Schwab, 2003), que potencialmente contribuye a los mecanismos de lesión secundaria (Blight, 1994; Bunge, Puckett, y Hiester, 1997).

Después de una lesión medular, también se han observado **alteraciones en la homeostasis iónica**. Específicamente en los niveles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en la zona de lesión (Balentine y Spector, 1977; Chesler et al., 1994; Kwo et al., 1989; Young y Koreh, 1986). Además de la ruptura física de las membranas celulares, efectos más sutiles, como el fallo de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Faden et al., 1987), pueden producir grandes incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  y sodio intracelulares mientras disminuyen los niveles de  $\text{K}^+$  (Balentine y Spector, 1977). La despolarización de la membrana celular por del fallo de la ATPasa también contribuye a la entrada de sodio a través de los canales de  $\text{Na}^+$  no-desactivables (la isoforma Nav1.6 en fibras miélicas) (Stys, 2005). La hipótesis del influjo de  $\text{Na}^+$  como iniciador de los mecanismos de lesión en la sustancia blanca fue demostrada por la administración *in vivo* de bloqueadores del canal de  $\text{Na}^+$ , obteniendo una disminución en el daño causado en la sustancia blanca y mejora en la recuperación funcional (Agrawal y Fehlings, 1997; G. Schwartz y Fehlings, 2001; Teng y Wrathall, 1997). En cuanto a mecanismos de desequilibrio iónico axonal, Stys y colaboradores (1992) aportaron evidencias convincentes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en los axones como consecuencia del influjo de sodio y derivada de la función inversa de los intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Stys et al., 1992). Este modelo se ha implicado en varias formas de daño axonal (trauma, aplastamiento, sección, hipoxia y toxinas), convergiendo en un modelo de dos fases de la entrada de calcio: por influjo inicial de  $\text{Na}^+$  y por función inversa de los intercambiadores (LoPachin y Lehning, 1997).

La entrada excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas resulta en muerte celular vía segundos mensajeros, incluyendo activación de proteínas quinasas, fosfolipasas, proteasas, especies reactivas de oxígeno y disfunción mitocondrial (Lipton y Rosenberg, 1994; Lu et al., 2000). Los altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activan proteasas ubicuas, las calpains,

resultando en degradación de las proteínas del citoesqueleto, neurofilamento 68 (NF68) y neurofilamento 200 (NF200), así como de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), comprometiendo la integridad axonal y su funcionamiento (Banik et al., 1997; Banik et al., 1998; Schumacher et al., 1999; Schumacher et al., 2000).

Fuera de los desarreglos estructurales y fallos en la conducción axonal que resultan de la despolarización de la membrana, la activación de canales sensibles a voltaje es una ruta potencial de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a los axones, conllevando a lesión secundaria (Park et al., 2004).

Los **radicales libres** son moléculas que poseen electrones no pareados, lo que los hace altamente reactivos a lípidos, proteínas y DNA. El oxígeno molecular posee dos de tales electrones no pareados y sus derivados reactivos, como el ión superóxido, son los más frecuentemente producidos, jugando un importante papel fisiopatológico en las lesiones del SNC (Christophe y Nicolas, 2006; Demopoulos et al., 1980; Loh et al., 2006).

El ión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) es formado gracias a un transporte de electrones incompleto en la mitocondria. Este ión superóxido es convertido a peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por la superóxido dismutasa y éste a su vez en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  por la catalasa. En presencia de hierro libre, liberado por la hemoglobina, transferrina o ferritina ya sea por disminución del pH o por radicales de oxígeno, el peróxido de hidrógeno forma radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), altamente reactivos. Estos radicales libres pueden producir una oxidación progresiva de los ácidos grasos en la membrana celular (**peroxidación de lípidos**), causando una progresión geométrica de la oxidación y generando más radicales libres que propagan la reacción a través de la superficie celular (Braugher y Hall, 1992; Hall y Braugher, 1986; Kwon et al., 2004; McCall et al., 1987). Los radicales libres son producidos como consecuencia de la activación de enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la fosfolipasa  $\text{A}_2$  (Chan y Fishman, 1980), la sintasa de óxido nítrico (Bredt y Snyder, 1990) y la xantina-oxidasa (Atlante et al., 1997; McCord, 1985), y por malfuncionamiento oxidativo de la mitocondria que al ser expuesta a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  induce un rápido incremento en la producción de radicales libres (Carriedo et al., 1998; Carriedo et al., 2000; Dykens, 1994). Después de una lesión tisular, se produce un incremento de los productos de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Hall y Braugher, 1982; Kurihara, 1985), con una disminución en los niveles de colesterol de los tejidos y la aparición de productos de oxidación derivados de éste (Anderson et al., 1985; Demopoulos et al., 1982a), también se produce una activación de la guanilato ciclasa (sensible a la peroxidasa), con el subsecuente incremento de GMPc (Hall y Braugher, 1982), una inhibición temprana de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

(sensible a la peroxidación de lípidos) y una disminución en los niveles de antioxidantes del tejido (Pietronigro et al., 1983; Saunders et al., 1987). Todos estos cambios conspiran colectivamente para inducir el colapso metabólico y la subsecuente muerte celular apoptótica o necrótica.

**Muerte celular** necrótica y apoptótica, y formas intermedias, ocurren después de un trauma del SNC, incluido la lesión de médula espinal (Beattie et al., 2000). La apoptosis es una forma de muerte celular programada que, a diferencia de la necrosis, es un proceso activo que se caracteriza por encogimiento celular, agregación de cromatina y núcleos picnóticos (Sekhon y Fehlings, 2001). En la apoptosis, al morir las células son fagocitadas sin iniciar una respuesta inflamatoria o sin descargar el contenido celular en el medio extracelular (Lou et al., 1998). La apoptosis es un proceso regulado con una secuencia de pasos de activación que requieren energía y síntesis específicas de macromoléculas así como también transcripción *de novo* de genes (Sekhon y Fehlings, 2001). La necrosis, originada por desordenes no fisiológicos (Lou et al., 1998), se caracteriza por un hinchamiento celular con daño mitocondrial y disrupción de la homeostasis interna, llevando a lisis de membranas, liberación del contenido intracelular y una intensa respuesta inflamatoria (Cohen, 1993; Majno y Joris, 1995). La necrosis no tiene requerimientos energéticos, debido a que no hay transcripción *de novo* de genes y no ocurre síntesis de nuevas proteínas ni de ácidos nucleicos (Bargmann, 1991; Casha et al., 2001).

Después de una lesión por contusión de la médula espinal, aparte de la ruptura de membranas que causa en algunas células una muerte necrótica inmediata, las intactas y parcialmente dañadas, quedan vulnerables a la muerte celular por ataque bioquímico de radicales libres (Braugher y Hall, 1992) y aminoácidos excitadores que pueden ser liberados por las neuronas y otras células. Además, la reducción del flujo sanguíneo hace que el ambiente medular se torne hipóxico lo que puede causar muerte necrótica y apoptótica (Mattson, 1998; Toborek et al., 1999). La liberación masiva de ácido glutámico puede matar las células por activación de receptores AMPA y subsecuente activación de receptores NMDA, los cuales permiten tal entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que la célula se hincha y estalla, causando una típica muerte necrótica. Por otro lado, las células lesionadas en menor grado pueden recuperarse o terminar muriendo por apoptosis (Choi, 1996). La expansión de la lesión comporta un inicio del daño secundario por necrosis causada por muerte celular excitotóxica, seguida por apoptosis (Beattie et al., 2002).

Crowe y colaboradores (1997) identificaron que, después de una lesión medular, ocurría muerte apoptótica de los oligodendrocitos de los tractos de sustancia blanca y que ésta

ocurría entre 24 horas y 3 semana después de la lesión (Crowe et al., 1997). La muerte apoptótica de los oligodendrocitos ocurre no sólo en el epicentro de la lesión, también en las áreas en donde se está produciendo degeneración walleriana en los tractos ascendentes y descendentes de la sustancia blanca (Emery et al., 1998), lo que puede contribuir a la desmielinización que también suma al déficit funcional (Beattie et al., 2000). Una familia intracelular de proteasas cisteín-aspartato, las caspasas, juegan un importante papel en esta muerte apoptótica. La activación de la caspasa-3, que corta varios sustratos esenciales en la vía apoptótica, es disparada por eventos cascada arriba que llevan a la liberación del citocromo c de la mitocondria y la subsecuente transactivación de la procaspasa-9 por Apaf-1. Esos componentes cascada arriba y cascada abajo de la vía apoptótica de la caspasa-3 son activados después de una lesión traumática y puede ocurrir de forma temprana en neuronas en la zona de la lesión y, horas a días más tarde, en la oligodendroglía, tanto adyacente como distante a la zona de la lesión (Rupinder et al., 2007; Springer et al., 1999). Esta muerte temprana observada en neuronas después de una lesión de la médula espinal también está relacionada con respuestas asociadas al estrés de retículo, las cuales, en éste caso, terminan favoreciendo la apoptosis. Es así que, no sólo se ve una rápida activación de caspasa-3, sino que también de caspasa-12, que se encuentra relacionada con la producción incrementada y nuclearización del factor de transcripción proapoptótico, CHOP (Penas et al., 2007).

### 3.2. Enfermedades neurodegenerativas que afectan la médula espinal

Aunque se han identificado diferentes disfunciones celulares, está ampliamente aceptado que la mayoría de los trastornos del sistema nervioso durante el desarrollo, tras lesiones y en procesos degenerativos presentan una serie de mecanismos neurotóxicos comunes e interconectados. Los mejor documentados son el malplegamiento y agregación de proteínas (Ross y Poirier, 2004), la disfunción mitocondrial (Kwong et al., 2006), el estrés oxidativo (Halliwell, 2006), la neuroinflamación (Block y Hong, 2005) y la excitotoxicidad (Salinska et al., 2005).

#### 3.2.1. *Enfermedades neurodegenerativas agudas*

En las enfermedades neurodegenerativas agudas, un insulto abrupto (infarto vascular en la enfermedad cerebrovascular, percusión en la lesión traumática) desencadena una secuencia de eventos que producen daño neuronal irreversible, como la ruptura de la barrera

hematoencefálica, cambios en la perfusión cerebral y medular, liberación de citoquinas e iniciación de apoptosis, así como excitotoxicidad. En tales condiciones, hay una clara evidencia del incremento en las concentraciones de ácido glutámico y la subsecuente muerte neuronal mediada por activación de los receptores NMDA.

La interrupción en el flujo sanguíneo al SNC conduce a un rápido e irrevocable fallo energético y a un descenso dramático en los niveles intracelulares de ATP. Las consecuencias serán un incremento en la concentración extracelular de ácido glutámico y sensibilización de las neuronas por una excitotoxicidad débil. La concentración de ácido glutámico extracelular aumenta después de una isquemia cerebral (Benveniste et al., 1984) y la extensión de este aumento se ha correlacionado con el tamaño de la lesión que subsecuentemente se desarrolla (Butcher, Bullock et al., 1990).

Diversos estudios en infartos isquémicos producidos en animales de laboratorio muestran que la extensión de la lesión puede ser atenuada por agentes que interactúan con los receptores de aminoácidos excitadores. En general, se ha visto que antagonistas del receptor AMPA son más activos en modelos de isquemia global, mientras que en isquemia focal, los antagonistas de ambos receptores, NMDA y AMPA, muestran una actividad moderada (McCulloch, 1992; Meldrum, 1990) y en modelos de isquemia permanente, son los antagonistas del receptor NMDA los que muestran mejor eficacia (Salinska et al., 2005).

### *3.2.2. Enfermedades neurodegenerativas crónicas*

Actualmente hay datos que incriminan a un defecto en los mecanismos de transporte del ácido glutámico en la esclerosis lateral amiotrófica y a un proceso de excitotoxicidad lenta en las enfermedades de Huntington y de Parkinson, que sugieren la participación de un proceso excitotóxico como factor patogénico en estas enfermedades.

Histopatológicamente la **esclerosis lateral amiotrófica** (ELA) se caracteriza por una pérdida selectiva de motoneuronas, tanto superiores como las espinales. Este patrón de pérdida neuronal se puede imitar en animales induciendo una lesión excitotóxica con kainato (Hollmann y Heinemann, 1994), o una excitotoxicidad lenta por inhibición de la recaptación de ácido glutámico (Rothstein et al., 1993). Ambas formas de excitotoxicidad involucran tanto al receptor NMDA como al AMPA, siendo éste último el que predomina en la excitotoxicidad de neuronas motoras (Carriedo et al., 1996; Estevez et al., 1995; Stewart et al., 1991). En la zona ventral de la médula espinal de pacientes con ELA, la edición del RNAm de la subunidad GluR-2 del receptor AMPA se encuentra reducida, lo



que favorecería una mayor permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de los canales ya que los receptores AMPA conformados por esta subunidad son impermeables al  $\text{Ca}^{2+}$  (Hollmann et al., 1991). También se ha observado una disminución de la proteína del transportador glutamatérgico EAAT-2 en la médula espinal y la corteza motora (Bristol y Rothstein, 1996; Rothstein et al., 1995).

Cerca del 10% de los casos de ELA son formas familiares. Uno de los factores genéticos responsables de la enfermedad fue identificado por Rosen y colaboradores (1993), como una mutación en el gen que codifica a la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta identificación llevó al desarrollo de un ratón transgénico que expresa la SOD humana mutante. Estos ratones presentan cambios citopatológicos similares a los observados en la ELA humana, como hinchamiento axonal, vacuolización de mitocondrias y agregación de neurofilamentos (Dal Canto y Gurney, 1994; Tu et al., 1996). Estos cambios también incluyen daño a astrocitos y una recaptación deficiente de ácido glutámico (Bruijn et al., 1997). Los cambios observados en estos animales han llevado a sugerir que el estrés oxidativo que genera la enzima mutante estaría disparando un proceso de excitotoxicidad.

### 3.2.3. *Enfermedades Neurodegenerativas inflamatorias*

En enfermedades inflamatorias del SNC, como la esclerosis múltiple, la excitotoxicidad no está implicada en el proceso patogénico primario, pero aún así, se ha demostrado que monocitos activados pueden liberar, o causar la liberación, de sustancias excitotóxicas como el ácido quinolínico (Heyes et al., 1996; Saito et al., 1992) que contribuyen a agravar el daño al sistema nervioso. En el caso de la infección del sistema nervioso central por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hay evidencia de que una proteína de la cubierta viral puede disparar un proceso de excitotoxicidad.

La **esclerosis múltiple** (EM) es considerada una enfermedad inflamatoria crónica del SNC que conduce al desarrollo multifocal de placas de desmielinización. Las características patológicas de las lesiones de esclerosis múltiple incluyen inflamación con linfocitos T y B y macrófagos/microglía, desmielinización con pérdida de oligodendrocitos durante la enfermedad crónica y grados variables de remielinización, pérdida axonal secundaria, y gliosis con proliferación de astrocitos (Bruck y Stadelmann, 2005).

Al comienzo de la enfermedad, las células inflamatorias liberan citoquinas que inducen la actividad de la indolamina 2,3-dioxigenasa; esta enzima metaboliza triptófano por la vía de la kinurenina, y su producto final es la neurotoxina ácido quinolínico, la cual es agonista del receptor NMDA, y por lo tanto puede producir apoptosis por estimulación de los

receptores glutamatérgicos neuronales. La microglía activada debido a la inflamación, actúa como fuente principal de esta neurotoxina (Leonard, 2007).

En el modelo más comúnmente usado de ésta enfermedad, la encefalomiелitis autoinmune, se ha visto un déficit en los astrocitos de las enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, responsables de la degradación del glutamato tomado del espacio extracelular. Este déficit puede conducir al incremento en los niveles de glutamato extracelular y a la neurotoxicidad vista en la enfermedad. Los daños neurológicos en la encefalomiелitis autoinmune mejoran con el uso de fármacos dirigidos a modular el sistema glutamatérgico, como es el caso de la memantina y el riluzol (Hemmer y Hartung, 2007; Salinska et al., 2005).

#### **4. Modelos de excitotoxicidad *in vitro***

Modelos experimentales *in vitro* son frecuentemente usados para estudiar los cambios morfológicos y bioquímicos relacionados a procesos de degeneración debido a que ellos permiten un mejor control del ambiente extracelular. Es por esto que se viene haciendo uso de diferentes modelos *in vitro* de excitotoxicidad que varían tanto en la composición celular (neuronales o mixtos), como en el grado de complejidad (monocapa u organotípicos).

Entre los modelos de excitotoxicidad en monocapa, se encuentra el inducido por glutamato o AMPA en cultivos primarios de neuronas corticales. Los cuales han sido usados tanto para evaluar los mecanismos de acción de la excitotoxicidad (Beart et al., 2007; Chung et al., 2005; Glassford et al., 2002; Schubert y Piasecki, 2001; W. Xu et al., 2007), como los mecanismos de neuroprotección. Con éste modelo se han estudiado los efectos protectores contra la excitotoxicidad de agentes como, ligandos del receptor sigma (DeCoster et al., 1995), eschizandrina (Cheng et al., 2008), litio (Chuang, 2005; Hashimoto et al., 2002b), timosina beta 4 (Popoli et al., 2007), ácido linoleico conjugado (Joo y Park, 2003) y otros fármacos nuevos (acteosidos (Koo et al., 2006a), 15-MPA (Koo et al., 2006b), 1MeTIQ (Antkiewicz-Michaluk et al., 2006), hesperetina (Cho, 2006). Además, este modelo también ha servido para señalar posibles blancos terapéuticos para contrarrestar la excitotoxicidad, tales como la adenilil ciclasa (Wang et al., 2007), la neuroserpina (Lebeurrier et al., 2005) y la ciclooxigenasa-2 (Mirjany et al., 2002).

También están los modelos que usan la lesión excitotóxica de cultivos primarios de neuronas hipocampales. Estos cultivos lesionados con agonistas de receptores ionotópicos de glutamato sirven para evaluar los mecanismos de acción de la excitotoxicidad

(Deshpande et al., 2007; Simpkins et al., 2003) y para evaluar agentes neuroprotectores tales como: Dextran sulfato, que modula las respuestas del receptor AMPA y la activación de ERK1y 2 (Chicoine y Bahr, 2007); galanina, que contrarresta los efectos producidos por altas concentraciones de glutamato como son regulación al alza de c-Fos y las alteraciones masivas observadas en núcleo(Elliott-Hunt et al., 2004; Pirondi et al., 2005) y el ácido ursólico, que disminuye el daño causado por excitotoxicidad inducida con kainato, protegiendo a las mitocondrias y reduciendo la producción de radicales libres (Shih et al., 2004). La lesión con kainato de cultivos primarios de neuronas hipocampales es usada como modelo *in vitro* de epilepsia (Zemlyak et al., 2007).

Otro modelos de excitotoxicidad son los cultivos disociados de médula espinal, estos pueden ser mixtos (De Paola et al., 2008; Greig et al., 2000; Tikka et al., 2002; Urushitani et al., 2001), se siembran células gliares y neuronas obtenidas del asta ventral; purificados (De Paola et al., 2008; Duong et al., 1999; Jahn et al., 2006), se parte de los cultivos mixtos y se separan las motoneuronas; o cocultivos, se inicia con una monocapa de células gliares maduras sobre la que se siembran las motoneuronas de origen embrionario (Bar, 2000; Carriedo et al., 1996; Regan, 1996; Sen et al., 2008; Vandenberghe et al., 1998; Vandenberghe et al., 2000; Vargas et al., 2006). Éstos, al igual que los anteriormente descritos, son lesionados con agonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato (Bar, 2000; Carriedo et al., 1996; Regan, 1996; Sen et al., 2008; Vandenberghe et al., 1998; Vandenberghe et al., 1998) y son usados tanto para describir los procesos y mecanismos de la excitotoxicidad, como para probar agentes neuroprotectores (Abood et al., 2001; Estevez et al., 1995; Nakamizo et al., 2000; Tikka et al., 2002). En estos cultivos se usan los agonistas de los receptores AMPA/kainato para modelar lesiones crónicas como las observadas en enfermedades neurodegenerativas como ELA (Urushitani et al., 2001) y agonistas del receptor NMDA para modelar aquellas de tipo agudo como trauma o isquemia (Urushitani et al., 2001).

Entre los modelos organotípicos están los cultivos de explantes de hipocampo lesionados con agonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato, AMPA (Bernardino et al., 2005), Kainato (Khaspekov et al., 2004) y NMDA (Keynes et al., 2004; Kristensen et al., 2001; Vornov et al., 1991), los cuales muestran mecanismos de excitotoxicidad más parecidos a los observados *in vivo* que aquellos reportados para cultivos neuronales primarios (Kristensen et al., 2001). Este modelo se ha usado para evaluar los mecanismos que actúan en la excitotoxicidad (Abdel-Hamid y Tymianski, 1997; Bernardino et al., 2005; Blaabjerg et al., 2001; Khaspekov et al., 2004; Kristensen et al., 2001; Liu et al.,

2001; Liu et al., 2001b; Mulholland y Prendergast, 2003) y para evaluar las propiedades neuroprotectoras de fármacos como EPO y su derivado no eritropoyético CEPO (Montero et al., 2007), los efectos neuroprotectores de agonistas de mGluR1 (Blaabjerg, Fang, Zimmer, y Baskys, 2003) y receptor GABA(A) (Kristensen, Noraberg, y Zimmer, 2003), los ejercidos por la activación del NPY (Silva et al., 2003; Xapelli et al., 2008) y los efectos neuroprotectores ejercidos por los antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato (Karanian, Baude, Brown, Parsons, y Bahr, 2006), entre otros. Este tipo de cultivos también han sido utilizados para modelar isquemia (Montero et al., 2007; Vornov et al., 1991), o enfermedades neurodegenerativas (Bernardino et al., 2005; Mitrasinovic et al., 2005).

Los explantes corticoestriatales han sido utilizados para estudiar la excitotoxicidad producida por AMPA, Kainato y ácido quinolínico (Whetsell y Schwarcz, 1983; Whetsell, Allen, y Tulipan, 1989) y los efectos neuroprotectores de NBQX, un antagonista del receptor AMPA (Kristensen et al., 1999; Massieu y Tapia, 1994; Zimmer et al., 2000). Los cultivos lesionados con ácido quinolínico también se han utilizado para generar un modelo de enfermedad de Huntington (Whetsell y Schwarcz, 1989).

Otro modelo de excitotoxicidad, es el modelo crónico de lesión por glutamato en cultivos organotípicos de médula espinal de rata postnatal. Este usa treohidroxiaspartato (THA), un inhibidor del transportador de glutamato muy utilizado para modelar esclerosis lateral amiotrófica (ELA). (Rothstein et al., 1993). En este modelo se consigue una pérdida lenta, pero progresiva de MNs debida a la acumulación excesiva a nivel extracelular de glutamato. La toxicidad observada se ejerce vía receptores no NMDA, ya que antagonistas del receptor NMDA no fueron neuroprotectores (Rothstein et al., 1993). Este modelo ha sido utilizado para evaluar los efectos protectores contra la excitotoxicidad por glutamato de células madre neuronales (Llado et al., 2004), precursores restringidos a glía (Maragakis et al., 2005) y evaluación de diferentes fármacos incluyendo antioxidantes e inhibidores de la NOS, antagonistas de receptores no-NMDA, bloqueadores de la liberación presináptica y síntesis (Rothstein y Kuncl, 1995).

Finalmente, otro de los modelos de neurotoxicidad que se usa es la lesión inducida por glutamato de cultivos de neuronas retinales. El glutamato es uno de los neurotransmisores de la retina y la liberación sináptica de este se ve aumentada después de una lesión y, al igual que en las lesiones agudas cerebrales y medulares, los antagonistas del receptor NMDA son capaces de revertir la muerte neuronal causada por esta (Senda et al., 1998; Zhang et al., 2000). Estos cultivos pueden ser disociados (Ruscher et al., 2007; Sakai et al.,

2006; Senda et al., 1998; Thompson et al., 2006; S. Zhang et al., 2000), u organotípicos, siendo estos últimos de origen postnatal (Perez-Leon et al., 2003), o adulto (Ruscher et al., 2007; Rzczinski et al., 2006). Para este tipo de modelos también se hace uso de neuronas retinales de pollo (Centuriao et al., 2005; Lamas et al., 2005; Paes-de-Carvalho et al., 2005; Santos et al., 2001) y humanas (Bucolo et al., 2006; Liang et al., 2004). Los cultivos neuronales de retina sometidos a una lesión excitotóxica son utilizados para evaluar el efecto y mecanismo de acción de la excitotoxicidad, junto con el de agentes neuroprotectores, en las neuronas retinales (Bucolo et al., 2006; Centuriao et al., 2005; Louzada et al., 2004; Ruscher et al., 2007; Senda et al., 1998; Taguchi et al., 2006).

Los métodos basados en el uso de agonistas de los receptores AMPA y kainato e inhibidores de la recaptación de glutamato proveen un excelente método para la evaluación de mecanismos de toxicidad crónica y el sondeo de fármacos protectores contra este tipo de lesión (Rothstein y Kuncl, 1995), pero no son un buen modelo para la evaluación de procesos similares causados por una lesión aguda, en donde se ha descrito que los receptores de NMDA juegan el papel más definitivo (Meldrum y Garthwaite, 1990).

Además, cultivos corticales, retinales e hipocampales parten de células embrionarias y la edad de los cultivos es importante debido a que la sensibilidad a glutamato depende del tipo de receptor que las células están expresando, y este varía según el estado de maduración de las neuronas (De Paola et al., 2008). También se ha de tener en cuenta la importancia de la interacción neurona-glía debido a que esta mejora las propiedades morfológicas de las neuronas, aumenta su viabilidad y varía su sensibilidad a los estímulos excitotóxicos (Comoletti et al., 2001; De Paola et al., 2008; Vornov et al., 1991). Por otro lado, los cultivos en monocapa, aunque interactúan neurona-neurona o neurona-glía, en cultivos mixtos, no mantienen los circuitos locales y la integridad de estos influye en la respuesta ante la lesión (Mulholland y Prendergast, 2003; Vornov et al., 1991).

## **5. Estrategias farmacológicas de neuroprotección de la médula espinal**

Como ya hemos visto, la patofisiología de la lesión medular incluye un mecanismo de lesión mecánica primaria, en el cual poco podemos intervenir, y un mecanismo de lesión secundaria, que puede ser modulado (Bracken et al., 1990).

En el área de la lesión espinal varios agentes neuroprotectores tales como gangliosidos, bloqueadores de canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , factores de crecimiento, así como bloqueadores de los procesos excitotóxicos, han sido reportados como efectivos en el tratamiento de la lesión espinal. Más recientemente el uso de antagonistas de calpaina, estrategias

antiinflamatorias y antiapoptóticas, así como agentes dirigidos al AMPc, también han sido investigados con resultados variados (Baptiste y Fehlings, 2006; Blight y Zimber, 2001; Bramlett y Dietrich, 2007).

Simultáneamente han sido desarrollados y evaluados compuestos que tienen efectos multipotenciales en varios de los mecanismos de lesión identificados. Los primeros de tales agentes han sido hormonas tales como corticoesteroides, la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y progesterona, o sus análogos sintéticos como las dikertopeperazinas, que son similares al producto metabólico activo de la TRH (Baptiste y Fehlings, 2006; Baptiste y Fehlings, 2007; Faden et al., 2005).

Los efectos neuroprotectores de la eritropoyetina y sus derivados que carecen de función eritropoyética, también han sido reportados en modelos animales de lesión y han sido propuestos como reflejo de acciones multifactoriales (Hasselblatt, et al., 2006). Estos agentes y su acción en lesiones medulares se encuentran resumidos en la tabla 1. Agentes como TM, GM-1 y GRH no han mostrado, en ensayos clínicos, que ayuden a la recuperación funcional o incluso han presentado resultados negativos (Baptiste y Fehlings, 2006; Bracken et al., 1997). Otros como la nimodipina necesitan de un adyuvante para actuar, ya que por sí sola no produce ningún efecto (Ross y Tator, 1991) y fármacos como los antagonistas de los receptores glutamatérgicos, que ejercen excelentes efectos neuroprotectores en modelos *in vivo* e *in vitro*, causan efectos psicomimético que dificultan su uso clínico (Baptiste y Fehlings, 2006; Doble, 1999). En cuanto a las neurotrofina, se ha observado que por sí solas son insuficientes y algunas de ellas, como el NGF, pueden ser tóxicas dependiendo de la configuración del receptor, contribuyendo a aumentar el daño secundario. Otras, como el BDNF, pueden contribuir a la muerte celular a través de la inducción de la sintasa de óxido nítrico, o como es el caso de las neurotrofinas, pueden aumentar la toxicidad por radicales libres (McDonald et al., 2002; Mcdonald et al., 2002; Schwab et al., 2006).

Actualmente los fármacos que lucen más prometedores se encuentran entre los agentes que son capaces de actuar por múltiples frentes a la vez, como es el caso de algunos corticoesteroides como la metilprednisolona, que tienen a su favor el ya estar aceptada para uso clínico, la eritropoyetina, algunos ligandos de las inmunofilinas, bloqueadores de los canales de Na<sup>+</sup> y agentes dirigidos al AMPc, que no sólo ayudan a la protección celular, sino que también están interviniendo en la regeneración axonal y en ayudar a sobreponerse al ambiente inhibitorio de la médula lesionada. Por lo que se detallaran mejor estos fármacos.

### 5.1.1. Esteroides

El uso de los corticoesteroides en lesiones de médula espinal empezó con el fin de reducir el edema medular, debido a las características antiinflamatorias e inmunosupresoras de éste tipo de fármacos (Ducker y Zeidman, 1994). Glucocorticoides sintéticos, tales como dexametasona y metilprednisolona, son ampliamente utilizados como agentes farmacológicos en el tratamiento de lesiones experimentales en el SNC (Anderson et al, 1994; Braugher y Hall, 1992). Ensayos clínicos han mostrado que son efectivos en el tratamiento agudo de la lesión espinal (Bracken et al., 1990; Bracken et al., 1992).

En general la protección tisular y neural reportada en ensayos *in vivo* e *in vitro* se debe a la disminución de la peroxidación de lípidos, aparentemente porque los corticoesteroides mismos están siendo sujetos a peroxidación y depleción por los radicales libres (Anderson et al., 1994). También la metilprednisolona suprime la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Yu et al., 2004) y reduce la concentración de eicosanoides en el tejido lesionado (Anderson et al., 1985; Liu y McAdoo, 1993; Saunders et al., 1987), disminuye la liberación de glutamato (Liu y McAdoo, 1993), bloquea la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (Cronstein et al., 1992), reduce la permeabilidad vascular (Xu et al., 1992) e inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  y otras citoquinas (Gorio et al., 2005; Xu et al., 1998a). Estos efectos contribuyen directamente a la preservación del tejido por estabilización de membranas y normalización de su fluidez (Taoka et al., 2001). Actualmente la metilprednisolona es el único fármaco aceptado como opción para el tratamiento de lesiones en la médula espinal. Ello se debe a los resultados obtenidos en los tres ensayos clínicos realizados entre la década de los 80 y los 90 (NASCIS I, II, III). En estos estudios se observó que la administración de un bolo de metilprednisolona (30 mg/Kg) dentro de las ocho primeras horas tras la lesión, junto con una administración continua del mismo fármaco por 48 horas (5,4 mg/Kg/h) -o un bolo de 30 mg/kg dentro de las 3 primeras horas después de la lesión, seguido de una infusión continua durante 24h- mejoraba las capacidades motoras y sensitivas de los pacientes con lesiones de médula espinal (Baptiste y Fehlings, 2006; Bracken et al., 1992 y 1997; Fehlings y Baptiste, 2005). Aún así a la metilprednisolona, se le cuestiona la eficacia como tratamiento debido a que las mejoras funcionales obtenidas son modestas.

**Tabla1.** Resumen de algunos agentes farmacológicos usados con fines neuroprotectores en lesiones de médula espinal

<b>Agente</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Ensayo clínico</b>	<b>Referencias</b>
Glucocorticoides (Metilprednisolona, Progesterona...)	Inhíbe la peroxidación de lípidos, Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias  Aumenta la supervivencia de neuronas después de una lesión de médula espinal. Regula al alza BDNF. Protege contra toxicidad por glutamato	<i>NASCIS</i> (Bracken et al., 1984; 1990 y 1997; Fehlings y Baptiste, 2005)	(Baptiste y Fehlings, 2006; Baptiste y Fehlings, 2007)  (Gonzalez et al., 2005; Labombarda et al., 2002; Thomas et al., 1999)
21-aminoesteroides (Tirilazad mesilato [TM])	Estabilizador de membrana a través de la inhibición de la peroxidación de lípidos dependiente de hierro. Antioxidante.	no	(Baptiste y Fehlings, 2006; Hall, 1993)
Gangliosidos (GM-1)	Estimula el crecimiento de neuritas y causa brote de neuritas en áreas lesionadas. Disminuye degeneración anterograda y retrograda. Disminuye liberación de aminoácidos excitotóxicos y regula PKC	<i>Maryland GM-1</i> (Geisler et al., 1991)  <i>Sygen GM-1</i> (Geisler et al., y Sygen Study Group, 2001)	(Coleman y Geisler, 2004; Dumont et al., 2001; Sabel et al., 1984; Seidl, 1999)
Hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y análogos	Antagonista de opioides endógenos, factor activador de plaquetas y aminoácidos excitadores. Aumenta flujo sanguíneo de la médula espinal y reduce degradación de lípidos	(Pitts et al., 1995)	(Dumont et al., 2001; Faden, 1997)



Antagonistas del receptor opioide (Naloxona)	Antagonista del incremento en los niveles endógenos de opiodes después de una lesión de médula espinal (éstos pueden contribuir a excitotoxicida)	<i>NASCIS II</i> (Bracken et al., 1990)	(Baptiste y Fehlings, 2006; Dumont et al., 2001; Olsson et al., 1995)
Antagonistas selectivos para receptores de glutamato (NBQX, Gaciclidina, AIDA, MPEP, MK801...)	Disminución de la excitotoxicidad	<i>GK-11</i> (Lepeintre et al., 2004)	(Baptiste y Fehlings, 2006; Doble, 1999; Dumont et al., 2001; Faden et al., 1988; Gaviria et al., 2000a; 2000b; Mills et al., 2002; Wrathall et al., 1997)
Bloqueadores de canales de $Ca^{2+}$ (nimodipina)	Disminuyen la acumulación intracelular de calcio. Atenúa el vasoespasmo.	(Pointillart et al., 2000)	(Dumont et al., 2001; Fehlings et al., 1989)
Bloqueadores de canales de $Na^{+}$ (TTX, QX314, Riluzol)	Disminución de la acumulación intracelular de $Na^{+}$	no	(Ates et al., 2007; Baptiste y Fehlings, 2006; Dumont et al., 2001; Rosenberg et al., 1999; Schwartz y Fehlings, 2001)
Antagonistas de calpaina	Previenen muerte celular y reducen déficit neurológico mientras preservan la integridad axonal y mielínica	no	(Ray et al., 2003; Schumacher et al., 1999; 2000; Sribnick et al., 2007; Zhang et al., 2003)
Inactivación de caspasas	Previene muerte celular por apoptosis	no	(Baptiste y Fehlings, 2006; Ray et al., 2003)

Ligandos de inmunofilinas (CsA; FK506; rapamicina)	Inhibición de la calcineurina y de la activación de la caspasa-3. Evita traslocación de citocromo c, promueven regeneración axonal y disminuye la peroxidación de lípidos. Efectos antiinflamatorios	no	(Ibarra y Diaz-Ruiz, 2006; Kaymaz et al., 2005; Lopez-Vales et al., 2005; Nottingham et al., 2002; Steiner et al., 1997)
Antagonistas de Rho	Reduce apoptosis neuronal y glial. Aumenta crecimiento de neuritas	<i>Cetrin</i> (Baptiste y Fehlings, 2006; 2007)	(Dubreuil et al., 2002)
Minociclina	Inhibe la 5-lipooxigenasa. Inhibe apoptosis vía atenuación TNF-alfa e inhibición de la liberación del citocromo c. Inhibe traslocación nuclear de NFkappa-B. Es antagonista de la metaloproteinasa-2 y 9.	(Baptiste y Fehlings, 2007)	(Brundula et al., 2002; Cho, et al., 2006; Dommergues et al., 2003; Festoff et al., 2006; Stirling et al., 2004; Teng et al., 2004; Tikka y Koistinaho, 2001; Wells et al., 2003; Zhu et al., 2002)
Eritropoyetina	Aumenta la expresión de Bcl-x <sub>L</sub> Atenúa activación de iNOS. Incrementa la actividad de enzimas antioxidantes como la superoxidodismutasa y la glutathionperoxidasa, disminuyendo la peroxidación de lípidos y disminuye la actividad de caspasa-3	<i>Accidente cerebrovascular</i> (Ehrenreich et al., 2002)	(Arishima et al., 2006; Baptiste y Fehlings, 2006; Erbayraktarr et al., 2003a; Gassmann et al., 2003; Kaptanoglu et al., 2004; Okutan et al., 2007)
Agentes dirigidos al AMPc (Rolipram)	Reducción de la activación de caspasa-3, aumento de AMPc y de la CREB. Disminución de la muerte de oligodendrocitos		(Nakao, 1998; Nikulina et al., 2004; Whitaker et al., 2008)

Factores neurotróficos (VEGF, BDNF, GDNF, NT-3; NGF, LIF)	Mejora nicho vascular. Actúan vía PI3K/Akt, MAPK, JAK/STAT. Modulan CREB. Aumentan expresión de Bcl-2. Mejoran supervivencia neuronal y neuritogenesis. Previenen apoptosis de oligodendrocitos		(Azari et al., 2006; Bradbury et al., 1998; Brockington et al., 2004; Cheng et al., 2002; Choi et al., 2007; Chou et al., 2005; Iannotti et al., 2004; Kao et al., 2008; Namiki et al., 2000; Sendtner et al., 1996; Sharma, 2006; Sharma, 2007; Tai et al., 2003; Tolosa et al., 2008; Tovar-Y-Romo et al., 2007; Widenfalk et al., 2003; Zang y Cheema, 2003)
Polietilenglicol (PEG)	Forma una película que sella las membranas rotas. Disminuye la peroxidación de lípidos por radicales libres		(Borgens y Shi, 2000; Laverty et al., 2004; Liu-Snyder et al., 2007; Luo et al., 2002; Luo et al., 2004)

### 5.1.2. *Ligandos de Inmunofilinas*

Diversos estudios han comprobado que tanto la ciclosporina A como el tacrolimus o FK506, dos ligandos de las inmunofilinas, tienen un importante efecto neuroprotector en diferentes modelos experimentales de isquemia (Becker et al., 2000; Benetoli et al., 2007; Brecht et al., 2003; Furuichi et al., 2003; Giordani et al., 2003), trauma (Lopez-Vales et al., 2005; Singleton et al., 2001; Voda et al., 2005) y desordenes neurodegenerativos (Almeida et al., 2004; Gold y Nutt, 2002) del sistema nervioso central. Ambos fármacos suprimen la inmunidad celular mediante el bloqueo de la proliferación de linfocitos T, reduciendo la expresión de interleuquina 2 (IL-2). Estos también inhiben la expresión de otras citoquinas como IL-3, IL-4, IL-5, INF- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y GM-CSF. Aunque se les considera inmunosupresores selectivos de la respuesta celular, también son capaces de alterar la actividad de los linfocitos B activados y de los granulocitos (Udina y Navarro, 2002).

Ciclosporina A y FK506 inhiben la respuesta inmune inhibiendo la calcineurina y ésta, a su vez disminuye la actividad de la iNOS (Dawson et al., 1993). Además, ambos fármacos evitan la traslocación del citocromo c (Li et al., 2006; Shichinohe et al., 2004; Springer et al., 2000). Por otro lado, se ha observado que parte del efecto neuroprotector y neuritogénico del FK506 no es dependiente de calcineurina y está mediado por la inmunofilina FKBP52 (Gold, 1999; Gold et al., 1999; Gold et al., 2005; Udina y Navarro, 2002). Este mecanismo depende de la sobreexpresión de proteínas de choque térmico (Hsp, *heat shock proteins*), en especial de la Hsp70 y la p23 (Gold y Villafranca, 2003a; Gold y Zhong, 2004; Ruan et al., 2008).

### 5.1.3. *Bloqueadores de canales de sodio*

El antagonismo farmacológico de canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje previene la degeneración axonal y reduce la pérdida de mielina preservando la función de los tractos espinales de la médula traumatizada (Rosenberg et al., 1999). La administración focal de tetrodotoxina (TTX) en la médula espinal contusionada de roedores resulta en una atenuación significativa de la pérdida axonal y reduce patologías axonales, este efecto protector se debe a la reducción del sodio iónico que entra a los axones lesionados. Adicionalmente, el bloqueo de los canales de sodio preserva la materia blanca a través de la prevención de la disrupción del sistema antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Agrawal y Fehlings, 1996).

Riluzol, un anticonvulsante bloqueador de canales de Na<sup>+</sup>, es neuroprotector y promueve la recuperación funcional después de una lesión de médula espinal en roedores (G.

Schwartz y Fehlings, 2001). Además de bloquear los canales de  $\text{Na}^+$ , riluzol también inhibe el flujo iónico a través de los canales NMDA, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y los canales de cloro sensibles a volumen (Debono et al., 1993; Noh et al., 2000), en concordancia, riluzol también bloquea la liberación presináptica de glutamato (Cheramy et al., 1992; Wang et al., 2004). Además de la acción inhibitoria de varios canales, riluzol tiene un efecto antioxidante que puede estar interviniendo en la directa inhibición de PKC (Noh et al., 2000) e incrementa la expresión de factores neurotróficos tales como BDNF, GDNF y GNF (Fumagalli et al., 2006; Katoh-Semba et al., 2002). El uso de riluzol como terapia es potencialmente factible, ya que ha recibido la aprobación para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica y, al contrario que la TTX, no tiene efectos neurotóxicos y cardiotóxicos adversos.

#### *5.1.4. Eritropoyetina*

La eritropoyetina (EPO), una glicoproteína producida en los riñones que incrementa la masa de eritrocitos, y su receptor (EPOR) funcionan como mediadores primarios de la respuesta normal fisiológica a la hipoxia. La eritropoyetina humana recombinante (rHU-EPO) es efectiva y ampliamente utilizada para el tratamiento de la anemia asociada a fallo renal, infecciones con HIV, cáncer y cirugía. Como otros miembros de superfamilia de las citoquinas, a la que EPO y su receptor pertenecen, éstas son ampliamente expresadas en el organismo, incluyendo el sistema nervioso (Digicaylioglu et al., 1995; Ghezzi y Brines, 2004; Morishita et al., 1997; Nagai et al., 2001). Al igual que en la periferia, EPO en el sistema nervioso central es inducida por hipoxia (Juul et al., 1998; Masuda et al., 1997), sin ser el único estímulo relevante para la producción de ésta citoquina en SNC. Daños metabólicos, incluida la hipoglucemia y fuertes despolarizaciones neuronales, generan especies reactivas de oxígeno mitocondriales que pueden incrementar la expresión de EPO en el SNC a través del factor inducido por hipoxia 1 (HIF1) (Chandel et al., 1998; Ghezzi y Brines, 2004), esto significa que EPO puede proteger al tejido nervioso bajo cualquier condición caracterizada por una deficiencia relativa de ATP en cara a demandas metabólicas incrementadas. Se han observado efectos neuroprotectores con EPO en lesiones experimentales de la médula espinal que pueden ser atribuidas a una variedad de mecanismos incluyendo, inhibición de la apoptosis, reducción de la inflamación y de la peroxidación de lípidos, modulación de la excitabilidad (Brines et al., 2000; 2003a; Sasaki et al., 2000) y movilización y proliferación de células madre neuronales (Shingo et al., 2001).

En un ensayo clínico reciente, la administración intravenosa de rHu-EPO fue estimada segura y demostró una fuerte tendencia a reducir el tamaño del infarto en pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular, además fue asociada con un mejor resultado clínico en comparación a los controles tratados con solución salina (Ehrenreich et al., 2002).

Aunque la evidencia soporta el rol neuroprotector de EPO, existe preocupación con respecto al tratamiento crónico, ya que se ha demostrado que el incremento dependiente de EPO del hematocrito puede amplificar la lesión del SNC (Wiessner et al., 2001). Actualmente se están haciendo esfuerzos para sintetizar derivados de la eritropoyetina que carezcan de efecto hematopoyético ya sea removiendo el residuo de ácido siálico para producir asialo-eritropoyetina (Erbayraktar et al., 2003b) o por carbamilación de residuos de lisina de la eritropoyetina produciendo CEPO (Leist et al., 2004). Ambos productos han demostrado ser neuroprotectores en modelos animales sin afectar la masa de eritrocitos.

#### *5.1.5. Agentes dirigido al AMPc*

A la fecha hay descritos tres inhibidores de la regeneración axonal que se encuentran relacionados con la mielina, Nogo, la glucoproteína asociada a mielina (MAG) y la glucoproteína de mielina de oligodendrocitos (OMgp). Como estas tres moléculas señalizan a través de una vía común, el receptor de nogo 1 (NR1), la inhibición farmacológica de esta vía es una estrategia lógica para promover la regeneración axonal. Otra estrategia es incrementar los niveles intracelulares de AMPc. Se ha observado que al inyectar un análogo del AMPc, dibutil-AMPc, en neuronas axotomizadas, éstas son capaces de sobreponerse a la barrera inhibitoria (Neumann et al., 2002; Qiu et al., 2002). Otra forma de aumentar el AMPc intracelular, es el uso de métodos indirectos tales como la estimulación de la adenilato ciclasa con forskolina, la cual ha mostrado que incrementa la tasa de regeneración de axones transectados en el nervio ciático (Kilmer y Carlsen, 1984), o la inhibición de la enzima que lo degrada, la fosfodiesterasa (PDE). Rolipram, el cual cruza fácilmente la barrera hematoencefálica, es un inhibidor específico de la subfamilia PDE4 de las fosfodiesterasas (Krause y Kuhne, 1988; Nikulina et al., 2004), la cual representan alrededor del 70% de las PDEs en tejido nervioso (Hannila y Filbin, 2008; Jin et al., 1999). Se ha descrito que el tratamiento con rolipram es capaz de mejorar el crecimiento de neuritas y de la regeneración axonal en presencia de inhibidores de la mielina, y de reducir la reactividad glial (Nikulina et al., 2004).

## **OBJETIVOS**





**Objetivo General:**

Estudiar el efecto de diversas terapias farmacológicas en un modelo *in vitro* de lesión excitotóxica por glutamato generado a partir de cultivos organotípicos de médula espinal de rata.

**Objetivos específicos:**

- Desarrollar un modelo *in vitro* basado en cultivos organotípicos de médula espinal útil para el ensayo de tratamientos neuroprotectores y proregenerativos.
- Caracterizar el modelo *in vitro* de lesión excitotóxica en cultivos organotípicos de médula espinal.
- Estudiar comparativamente el efecto del tratamiento con riluzol, rolipram, eritropoyetina y metílprednisolona, fármacos de potencial aplicación clínica en lesiones medulares, tras la lesión excitotóxica con glutamato en el modelo organotípico.
- Analizar el posible efecto neuroprotector del fragmento C terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica en el modelo de lesión excitotóxica de médula espinal.
- Estudiar las posibles vías de acción del FK506 en una lesión excitotóxica por glutamato en el modelo organotípico de médula espinal.
- Estudiar los efectos de agonistas del receptor sigma-1 sobre una lesión excitotóxica por glutamato en cultivos organotípicos de médula espinal.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### Cultivo organotípico de médula espinal

Se utilizaron ratas albinas de la cepa Sprague Dawley adquiridos a través del servicio de estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Los cultivos organotípicos de médula espinal se prepararon a partir de la región torácica de la médula espinal de ratas postnatales de 7 días (P7). Para estos cultivos se utilizó como base el protocolo previamente descrito por Corse (1999). Los animales fueron rápidamente sacrificados y la médula espinal torácica fue cuidadosamente removida y colocada en una solución salina de Hanks con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Sigma) suplementada con glucosa (6.0 mg/ml). En una campana estéril de flujo laminar, bajo lupa, se retiraron las meninges y cada médula, ya despojada de sus meninges, fue trasladada a otra placa con medio nuevo; en seguida, cada una de las médulas se puso sobre un filtro de nylon (41  $\mu\text{m}$ , Millipore) y se cortó transversalmente en láminas de 350  $\mu\text{m}$  en un *tissue choper* de McIlwain. Cada sección de médula espinal se trasladó cuidadosamente a cestillas de cultivo (Millicell-CM, Millipore), hasta un máximo de cinco por cestilla. Cada cestilla se ubicó dentro de placas de cultivo de seis pozos con 1,5 ml de medio de cultivo con antibiótico (penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se incubó a 37°C más 5%  $\text{CO}_2$ . Después del primer día el medio fue cambiado para remover el antibiótico e incubado por seis días para estabilizar el cultivo; de ahí en adelante el medio se cambió cada tercer día. Se utilizaron dos medios de cultivos, el medio estandar, MEM, que contenía 50% de MEM con sales y glutamina (Sigma), 25% de solución salina de Hanks (Sigma) y 25% de suero de caballo inactivado (Gibco) suplementado con Hepes 20 mM y D-glucosa (6 mg/ml); y el medio Neuro-Basal (NB) con B27 1X (Gibco), suplementado con glutamina (2 mM) y D-glucosa (6 mg/ml).

### Modelo *in vitro* de lesión medular excitotóxica

Después de dos semanas en cultivo, los explantes de médula espinal se trasladaron al tampón modificado de Locke (NaCl, 137 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 2.5 mM; KCl, 5 mM; D-Glucosa, 5.6 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 mM;  $\text{NaHCO}_3$ , 4 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,3 mM; Glicina, 0,01 mM; Hepes, 10 mM) con glutamato 50  $\mu\text{M}$  y se incubaron por 30 min a 37°C en 5%  $\text{CO}_2$ . Los explantes se lavaron durante 5 min en medio de cultivo y se transfirieron a placas de seis pozos con medio fresco. Los cultivos se incubaron durante dos días más antes de evaluar los efectos de la lesión por glutamato. Los controles se trataron de la misma forma, pero sin la adición de glutamato.

### Modelo *in vitro* de lesión mecánica

Pasadas dos semanas en cultivo, los explantes de médula espinal se lesionaron mecánicamente rodando dos veces sobre ellos un cilindro de acero inoxidable de 0,1124 g, 1,1 mm de diámetro y 14 mm de largo. Después de la lesión traumática, los explantes se devolvieron a la incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante dos días más. Los explantes control de médula espinal se mantuvieron bajo condiciones similares, pero sin causarles la lesión traumática.

### Adición de los fármacos

Después de madurar *in vitro* por 15 días los cultivos organotípicos de médula espinal, estos se lesionaron con glutamato y se lavaron en medio de cultivo. Las médulas destinadas a la evaluación del efecto de los fármacos se pusieron en medio NB suplementado con el fármacos de interés. Los fármacos utilizados fueron: FK506 (Fujisawa Pharmaceuticals, Osaka, Japan), eritropoyetina (EPO; Sigma), metilprednisolona (MP; Pharmacia, Barcelona, España), 2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol (riluzol; TOCRIS), 4-3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil-2-pirrolidinona (rolipram; TOCRIS), PRE084 (Sigma) y TeTx-Hc (donada gentilmente por el Dr. Aguilera).

### Ensayo de viabilidad celular

La muerte celular global en los explantes de médula espinal se evaluó mediante la toma del homodimero-1 de etidio (EthD, Live/Death viability Assay, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Para el ensayo los explantes fueron incubados en 1,5 μM de EthD diluido en el medio de cultivo, durante 24h. Las imágenes de los explantes se tomaron con la ayuda de una cámara digital (Olympus C-5050) acoplada al microscopio invertido de fluorescencia (Olympus BX-70) con un objetivo de 10x y manteniendo las mismas condiciones en la cámara (apertura del objetivo, tiempo de captura y corrección) para todos los cultivos organotípicos evaluados. El análisis se hizo con el programa ImageJ (U.S. National Institutes of Health) ajustando el umbral por encima del fondo y fijando el máximo a 256. La intensidad integrada se midió y se usó para calcular la muerte celular como porcentaje de la captación de EthD, con la fórmula: % captación de EthD = (Dtreat / Dmax) x 100, donde Dtreat es la intensidad integrada del explante tratado, y Dmax es la densidad integrada del incubado a 4°C durante 24h, éste representa, muy cercanamente, el máximo daño tisular (Adamchik et al., 2002). Finalmente, el porcentaje de protección del

tejido se calculó mediante la formula:  $[(100 - \% \text{ toma EthD del tratamiento}) \times 100] / (100 - \% \text{ captación de EthD del control})$ .

#### Cultivo de explantes de ganglio de la raíz dorsal

Para la extracción y cultivo de los explantes de ganglio de la raíz dorsal se siguió, básicamente el protocolo propuesto por Kosacka y colaboradores (2005) con algunas modificaciones. Ratas P7 se sacrificaron por sobre exposición a CO<sub>2</sub> y se decapitaron. Los ganglios de las raíces dorsales de ambos lados de la médula espinal se dejaron expuestos, se extrajeron y se colectaron en Hank's con Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> que se mantuvo en hielo. Para remover el tejido conectivo los ganglios se trataron con colagenasa (Sigma) al 0,1% durante 30 minutos a 37°C, se lavaron con Hank's y se pusieron en cubreobjetos redondos recubiertos con 0,01 mg/ml de PDL (Sigma) y 10% de vitrogen 100 (Collagen, Palo Alto, CA, USA). Para permitir la unión del explante al cubreobjeto, estos se incubaron durante 30 minutos con 50 µl de NB-B27 a 37°C. Una vez adheridos, los explantes se recubrieron con medio de cultivo (NB-B27 con antibióticos) que se suplementó con los diferentes fármacos a probar. Los explantes se incubaron durante 3 días a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% en atmósfera humidificada.

#### Cultivo de neuronas disociadas de ganglio de la raíz dorsal

Los ganglios de la raíz dorsal de ratas P7 se extrajeron y se recogieron en una solución salina de Hank's con Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, después de haber sido cuidadosamente limpiados de tejido conectivo. Los ganglios se sometieron a disociación enzimática con 0,1% de colagenasa a 37 °C durante 30 minutos, se incubaron con 1X de tripsina/EDTA (Sigma) y 1 mg/ml de DNasa (Sigma) durante 15 minutos a 37°C. Estos ganglios se terminaron de disociar mecánicamente con ayuda de una pipeta Pasteur cuya punta se redondeó y se adelgazó bajo la llama. Las células disociadas se resuspendieron en medio NB-B27 y se sembraron a una densidad aproximada de 7500 células por pocillo en una caja de 96 pozos, previamente recubierta con 0,01 mg/ml de PDL (Sigma) y 10% de vitrogen 100 (Collagen). Las células sembradas se trataron con diferentes concentraciones de PRE084 (1, 10 y 50 µM), BD1063 (30µM) y *chelerythrine* (5µM), y se incubaron durante 3 días a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% en atmósfera humidificada.

#### Ensayo de viabilidad celular con MTT

La actividad deshidrogenasa mitocondrial que reduce 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

Bromuro difeniltetrazolio (MTT) a formazán púrpura, se usó para determinar la viabilidad celular en un ensayo colorimétrico cuantitativo (Foroutan, Behbahan, y Anderson, 1996). Los cultivos organotípicos se incubaron con MTT (400µg/ml) directamente añadido al medio de cultivo por 3-4 h a 37°C. El medio se aspiró y el formazán producido se disolvió en DMSO. La absorbancia de cada muestra se cuantificó por espectrofotometría a 560 nm y la de referencia a 620 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad con respecto al cultivo control (cultivos no tratados).

### Western Blot

Los cambios en los niveles de proteína se determinaron por Western blot, para ello los cultivos se homogenizaron, con ayuda de una jeringa de insulina, en tampón RIPA modificado (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.5% Deoxicolato de sodio, 0,2% SDS, 100mM NaCl, 1mM EDTA) con un coctél de inhibidores de proteasas (10 µl/ml, Sigma) y fosfatasas (10 µl/ml, Sigma). La proteína se obtuvo por centrifugación del homogenado a 13000 rpm, recogiendo el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó con *BCA protein assay* (Pierce, Rockford, IL, USA). Se separaron iguales cantidades de proteína (40-50 µg) en geles de SDS-PAGE al 14% y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon en TBS con 0,05% de tween-20 y 5% de leche en polvo desnatada durante 30 min y se incubaron durante 12h a 4°C con el anticuerpo primario. Después de los lavados la membrana se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos con un anticuerpo secundario conjugado a HRP. La membrana se reveló usando el substrato de quimioluminiscencia, SuperSignal (Pierce). Las señales se capturaron en un aparato Gene Genome y se analizaron por densitometría de bandas con los programas Gene Snap y Gene Tools (Syngene).

### RT-PCR semicuantitativa

El ARN total de los cultivos organotípicos se extrajo con RNeasy mini kit (Qiagen). Se usaron 2µg de RNA total para ser transcritos inversamente con oligo(dT)<sub>18</sub> y cebadores (*primers*) aleatorios con la transcriptasa reversa SuperScript<sup>TM</sup>II (Invitrogen). Para la amplificación por PCR se utilizó 1µl de ADNc en presencia de 2,5 U Taq ADN polimerasa junto a los cebadores específicos que se diseñaron de acuerdo a secuencias publicadas en GenBank y sintetizados por Isogen Life Sciences (Isselstein, Holanda). La PCR se completó bajo las siguientes condiciones, un ciclo a 94°C durante 5 minutos; amplificación a 96°C durante 30 s, 55 o 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; la extensión final a



72°C por 10 minutos. El número de ciclos se halló experimentalmente para cada gen a analizar para fijarlo en la fase exponencial de la PCR y evitar condiciones saturantes. El control negativo se realizó sin la plantilla. Los productos de la PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 3% con SYBR safe™ (Invitrogen) y vistos bajo luz ultravioleta. La cantidad relativa de producto de la PCR se determinó por fotografía digital y análisis de la intensidad de la agarosa teñida con Gene Flash y Gene Tools (Syngene, Cambridge, UK). La medida semicuantitativa se expresó como la razón densitométrica con respecto a la densidad de la enolasa específica de neuronas. Los cebadores utilizados fueron: Las subunidades del receptor NMDA, NR1 (F:GCAGGTGGAGTTGAGTAG; R:CAGCTTGTTGTCCCGCACACA), NR2A (F:CCTCGAACCTTCAGTGCCT; R:AATGGCTGAGACGATGAGCAG) y NR3B (F:AGAATGGCATAGCACAGGTTG; R:ACGGCCAACCTGGCTGCTGTCAT) y para la enolasa específica de neuronas (F:GGGCACTCTACCAGGACTTTG; R:TGGACCAAGCTGCCAGT)

#### Inmunohistoquímica

Los cultivos organotípicos de médula espinal se fijaron en PFA al 4%, se lavaron con PBS y se desprendieron de los insertos. Los explantes se permeabilizaron con grados de metanol (50, 70 y 100%) durante 20 min cada uno, se incubaron en tampón de bloqueo (Tris-HCL 0,1M con NaCl 0,15M, pH 7,4 (TBS) con 5% de suero fetal bovino (SFB) y 0,3% de Triton X-100) durante 1h a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos primarios dirigidos contra, neurofilamento no fosforilado de 200 kDa (SMI-32, 1:5000, Stenberger), Proteína ácida fibrilar glial (GFAP, 1:1000, Chemicon),  $\beta$ III-tubulina (1:1000, Covance), acetilcolintransferasa (ChAT, 1:100, Chemicon), proteína de choque térmico 70 (Hsp70, 1:1000, Stressgen), isolectina B4 (IB4) y anti-IB4 (1:1000, Vector), proteína básica de la mielina (MBP, 1:500, Chemicon) o calbindina (1:500) durante 2 días a 4°C y agitación constante. La inmunoreactividad se detectó con anticuerpos secundarios (IgG) conjugados con los fluoróforos cianina 3 (Cy3) y cianina 2 (Cy2) (Jackson Immunoresearch). Los explantes se incubaron toda la noche a 4°C y en agitación constante, tras varios lavados, los explantes de médula se recogieron en portaobjetos gelatinizados, se secaron a 37°C durante 20 minutos, se deshidrataron en grados crecientes de etanol y se montaron en DPX (Fluka). Las láminas se observaron bajo el microscopio de epifluorescencia Olympus BX-51.



## **RESULTADOS**



# I

**Establecimiento y caracterización de un modelo *in vitro* de lesión excitotóxica de la médula espinal para el rastreo de fármacos neuroprotectores**



Los resultados de este trabajo de investigación se encuentran agrupados en tres grandes secciones en las que se trata el establecimiento del modelo y el uso de éste para ensayos de fármacos potencialmente neuroprotectores en lesiones medulares de tipo excitotóxico.

Esta primera sección trata específicamente sobre cómo se obtuvo el cultivo *in vitro* de médula espinal, su adaptación para el ensayo de fármacos y el tipo de lesión modelado. Finalmente se llega al ensayo de fármacos neuroprotectores, los cuales han sido utilizados, en su mayoría, a modo de validación del modelo de lesión excitotóxica. Entre los fármacos ensayados se encuentran la metilprednisolona (MP), la cual atenúa el daño espinal después de una lesión medular gracias a su efecto en la peroxidación de lípidos (Taoka et al., 2001), el riluzol que actúa sobre la transmisión glutamatérgica (Doble, 1996), el rolipram que aumenta los niveles de AMPc gracias a la inhibición de la PDE4 y a sus efectos sobre la glía en excitotoxicidad (Yoshioka et al., 2000; Nikulina et al., 2004) y la eritropoyetina (EPO) que media la protección del tejido neuronal después de lesiones mecánicas o isquémicas en la médula espinal (Bernaudin et al., 1999; Gorio et al., 2002; Montero et al., 2007).

Además del modelo de lesión excitotóxica, también se realizó un modelo de lesión por contusión como posible modelo *in vitro* de lesión primaria de la médula espinal siguiendo una modificación del protocolo descrito por Adamchick y colaboradores (2000) para explantes cerebrales.

Por otro lado, también decidimos probar si la adición de la TeTx-Hc era capaz de proteger a las MNs tras un daño excitotóxico por glutamato, debido a que se ha descrito que es capaz de activar vías de señalización ligadas con los receptores TrkA y TrkB, los cuales han sido relacionados con una mejora en la supervivencia, neuroprotección y neuritogénesis de las células neuronales (Chaib-Oukadour et al., 2004a; Gil et al., 2001 y 2003; Kaplan y Miller, 2000). El valproato (VP) también fue probado en los explantes lesionados con glutamato ya que se ha descrito como inhibidor de la apoptosis (Chuang, 2005), además de los efectos neuroprotectores que ejerce en modelos de ELA, isquemia e *in vitro* de excitotoxicidad (Kim et al., 2005; Peng et al., 2005; Rouaux et al., 2007).

Los trabajos comprendidos en esta sección son:

**Artículo 1.** Drug screening of neuroprotective agents on an organotypic-based model of spinal cord excitotoxic damage.

(Manuscrito).

**Anexo I.** Modelo *in vitro* de lesión por contusión en organotípicos de médula espinal de rata.

**Anexo II.** Cambios en el receptor NMDA durante la maduración *in vitro* de los cultivos organotípicos de médula espinal.

**Anexo III.** Efecto de la aplicación de la TeTx-Hc en un modelo *in vitro* de lesión excitotóxica por glutamato basado en cultivos organotípicos de médula espinal de rata.

**Anexo IV.** Ensayo del valproato como agente neuroprotector en explantes de médula espinal de rata sometidos a una lesión excitotóxica.



**Drug screening of neuroprotective agents on an organotypic-based model of spinal cord excitotoxic damage**

Mónica-Sofía Guzmán-Lenis, Xavier Navarro, Caty Casas

Group of Neuroplasticity and Regeneration, Institute of Neurosciences, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

**Corresponding author:** Dra. Caty Casas, Unitat de Fisiologia Mèdica, Edif. M, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain.

Tel: +34-935811348/1966, Fax: +34-935812986

E-mail: [caty.casas@uab.cat](mailto:caty.casas@uab.cat)



**ABSTRACT**

Damage to segmental motoneurons and to spinal cord parenchyma cause denervation atrophy to the muscles, contributing to the chronic disability originated by spinal cord injury (SCI) and spinal motor neuron diseases. After SCI, damage is promoted by several underlying mechanisms, including release of glutamate and consequent over-activation of glutamate receptors, mainly NMDA receptors, that lead to neuronal death. Due to the lack of effective treatments for such conditions, new alternatives need to be explored. In order to perform a relatively quick and high-fidelity drug screening, we optimized a postnatal rat organotypic spinal cord culture. By using a glutamate excitotoxic model of spinal cord damage on the explants, we compared the neuroprotective efficacy of four agents: methylprednisolone, erythropoietin, riluzole and rolipram. We evaluated the number of survival ventral motor neurons stained with the SMI32 antibody and estimated the cord tissue preservation by quantifying the amount of EthD fluorescent probe incorporated to the cells. The best tissue protection was achieved with riluzole (98%) whereas the highest motoneuron preservation was obtained with methylprednisolone (92%). The *in vitro* model used may serve to initiate comparative analyses of new compounds to narrow the choice for future neuroprotective agents to be tested *in vivo*.

**Keywords:** spinal cord injury, motor neuron disease, NMDA, neurodegeneration, rat.

## INTRODUCTION

Spinal cord injury (SCI) usually leads to irreversible paralysis and anesthesia in body regions below the level of the lesion due to interruption of axonal pathways, subjects also display impairments due to loss of segmental neurons (Milhorat et al., 1995; Collazos-Castro et al., 2005; Garcia-Alias et al., 2006). At the site of the lesion, neurons are destroyed, producing, among other effects, denervation atrophy of the segmental muscles affected (Curt and Dietz, 1996; Thomas et al., 1997). Several studies have pointed out the importance of neuroprotective therapeutical approaches to reduce the loss of spinal motoneurons (MNs) after injury (Teng et al., 1999; Nakajima et al., 2007).

After SCI, neuronal death is propagated by harmful events that include glutamate excitotoxicity (Tator and Fehlings, 1991; Lu et al., 2000; Sekhon and Fehlings, 2001). Within minutes following SCI, the release of glutamate increases  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  intracellular concentrations through the uncontrolled activation of glutamate receptors, leading to cell death (Choi, 1988; Lipton and Rosenberg, 1994). In particular, it has been shown that the over-activation of NMDA glutamate receptors is involved in the delayed neuronal and glial cell death following SCI (Wada et al., 1999). Glutamate toxicity plays also an important role in the neurodegenerative process associated with motoneuron diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Vajda, 2002).

Although the main histopathological features of human SCI have been reproduced in animal models (Noble and Wrathall, 1985; Basso et al., 1996; Metz et al., 2000; Gensel et al., 2006), it would be unbearable the screening of every potentially interesting neuroprotective drug *in vivo*. For this reason, the use of intermediate models that preserve tissue cytoarchitecture (Delfs et al., 1989; Stoppini et al., 1991) and mimic key features of *in vivo* lesions is advantageous.

By using rat organotypic spinal cord cultures subjected to excitotoxic insult, we have performed a comparative evaluation of the neuroprotective efficacy of methylprednisolone (MP), erythropoietin (EPO), rolipram and riluzole, which have been previously reported to be potentially useful to prevent the development of secondary injury and neuronal death after SCI by different mechanisms. MP is a synthetic glucocorticoid that attenuates spinal cord damage in preclinical models by reducing lipid peroxidation produced by free radicals and reactive oxygen species generated by cellular metabolism (Hall and Braughler, 1982; Taoka et al., 2001). Studies have demonstrated robust EPO-mediated protection after ischemic injury (Morishita et al., 1997; Sadamoto et al., 1998; Bernaudin et al., 1999), and SCI (Gorio et al., 2002; Brines et al., 2004; Montero et al., 2007). Rolipram, an inhibitor of

the phosphodiesterase type IV (PDE4) (Beglopoulos and Shen, 2006), attenuates the formation of the glial scar after SCI (Nikulina et al., 2004). Riluzole, a blocker of voltage-sensitive channels (Benoit and Escande, 1991; Hebert et reduces damage by ischemia in the spinal cord (Lang-Lazdunski et al., 1999) and prevents MN death after root avulsion (Nógrádi et al., 2007).

Our model of excitotoxic spinal cord damage resulted powerful enough to verify the neuroprotective efficacy of these agents and to allow a predictive strategy for SCI or motoneuron diseases where the excitotoxic component has a relevant role.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Organotypic spinal cord slice culture

Sprague Dawley rats of postnatal day 7 (P7) were euthanized by over-exposure to CO<sub>2</sub> and decapitated. Following exposure of the whole spinal cord, the thoracic segment was removed and placed in ice-cold high glucose-containing (6 mg/ml) Hanks balanced salt solution (HBSS) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Under sterile conditions, meninges and roots were removed and the spinal cord was sectioned into 350 µm thick slices with a McIlwain Tissue Chopper (Gomshall, Surrey, UK). Up to 5 sections were carefully transferred onto Millicell-CM (Millipore, Bedford, USA) culture plate inserts. Inserts were placed into a 6-well plate (Iwaki, Asahi techno glass, Chiba, Japan) containing 1.5 ml of culture medium per well with antibiotics (100 UI/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin) and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 24h. The following day, the medium was changed to remove antibiotics and incubated for the next 6 days to stabilize the culture. The culture media tested were either 50% standard Eagle's MEM (Sigma), 25% HBSS (Sigma) and 25% heat inactivated horse serum (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 20 mM HEPES and 6 mg/ml D-glucose (Stoppini et al., 1991; Rothstein et al., 1993), or Neurobasal medium (Gibco) with B27 (Gibco), 2 mM glutamine and 6 mg/ml glucose. The medium was changed twice per week until 15 days *in vitro* culture (DIV). All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of our institution, and followed the European Communities Council Directive 86/609/EEC.

### Excitotoxic insult

At 15 DIV, the slices on the inserts were placed on modified Locke's buffer (137 mM NaCl; 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 5.6 mM D-Glucose; 0.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.01 mM Glycine; 10 mM HEPES) with glutamate (30, 50 or 100 µM), and incubated for 30 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Then, they were placed on warm medium for 5 min to wash out the drugs, and finally transferred to warm fresh medium and incubated for two extra days. Control samples were placed in the same buffer without the addition of glutamate, but manipulated the same way. In order to assess the contribution of glutamate receptor types to the slice damage, other cultures were co-incubated with 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) (30 µM) or MK-801 (10 µM) (Research Biochemicals International, Natick, MA).

### **Drug treatment**

After glutamate exposure and wash out, different cultures were treated with various doses of methylprednisolone sodium succinate (MP; Pharmacia, Barcelona, Spain), erythropoietin (EPO; Sigma), 4-3-cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl-2-pyrrolidinone (Rolipram; TOCRIS), 2-amino-6-trifluoromethoxybenzothiazole (Riluzole; TOCRIS, Northpoint, Avonmouth, Bristol, UK), or vehicle for 1 or 2 days. EPO and MP were dissolved in water and rolipram and riluzole in DMSO.

### **Viability test**

Global cell death on cultured slices was assessed by cellular uptake of ethidium homodimer-1 (EthD) (Live/Death Viability Assay, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) after incubation with 1.5  $\mu$ M EthD for 24h. Images, from cultures of 3 different days with 4-5 slices per preparation, were taken with the aid of a digital camera (Olympus C-5050) attached to a fluorescence microscope (Olympus BX-70) using a 10x objective and the same camera settings (objective aperture, capture time and correction) for all the cultured slices. The analysis was done with ImageJ software (U.S. National Institutes of Health) by adjusting the threshold above the background and fixing the upper level at 256. The integrated density was measured and used to calculate cell death expressed as percentage of EthD uptake with the formula: % EthD uptake =  $(D_{\text{treat}} / D_{\text{max}}) \times 100$ , where  $D_{\text{treat}}$  is the integrated density of the treated slice and  $D_{\text{max}}$  is the integrated density of the slice incubated at 4°C for 24h, which closely represents the maximum damage (Krassioukov et al. 2002; Adamchick et al., 2000; Frantseva et al. 1999). The percentage of tissue protection was calculated with the formula:  $[(100 - \% \text{EthD Uptake treated sample}) / (100 - \% \text{EthD uptake of the control})]$ .

### **Immunohistochemistry**

Cultures from at least 3 different days-preparations with 4-5 slices per preparation corresponding to each treatment were analyzed by immunohistochemistry. Cultured slices were fixed with 4% paraformaldehyde for 1h at room temperature, rinsed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and removed from the inserts. Slices were permeabilized with a graded series of methanol (50, 70 and 100%) for 20 min each, incubated in blocking buffer (Tris-HCl 0.1 M, 0.15 M NaCl; pH 7.4 (TBS) with 3% bovine serum and 0.3% Triton X-100) for 1h and incubated with primary antibodies directed against non-phosphorylated heavy neurofilament (SMI32, 1:5000; Sternberger Monoclonals Inc.,

Baltimore, MD, USA), glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:1000; Chemicon, Temecula, CA, USA), Isolectin B4 (IB4, 1:1000; Vector, Burlingame, CA, USA), choline acetyltransferase (ChAT, 1:100; Chemicon), myelin basic protein (MBP, 1:500; Chemicon) or calbindin (1:500; Chemicon) for 2 days at 4°C. Immunoreactivity was detected with donkey Cy3 or Cy2 conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibodies (Jackson, West Grove, PA, USA) overnight at 4°C. After several washes, slices were dehydrated in a graded series of ethanol and mounted with DPX (Fluka, Buchs, Switzerland).

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were carried out using analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post hoc test. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ .



## RESULTS

### **Organotypic spinal cord culture in serum-free medium**

In order to compare the morphology, distribution and survival of MNs in the slices, they were cultured with either the standard serum-containing medium (MEM) (Rothstein et al., 1993) or Neurobasal serum free-based medium (NB) for 7, 10, and 15 DIV. The slices were then immunostained with the SMI32 antibody and for the presence of cholinergic marker (anti-ChAT) (Fig. 1). SMI32 antibody recognizes the non-phosphorylated epitope of heavy neurofilaments and it has been widely used as a developmental marker specific for spinal MNs (Tsang et al., 2000; Avossa et al., 2003). At 7 DIV, intensely SMI32 immunoreactive neurons were found in ventral and central regions of the grey matter, with similar distribution and number in sister explants cultured in the two media (Fig. 1 C,D). However, marked differences were found at 10 DIV, when the number of SMI32 labeled neurons in the slices cultured in MEM medium decreased significantly compared to NB medium (Fig. 1 E,F). By 15 DIV similar numbers of SMI32-positive neurons were found in both media (Fig. 1 G,H). At 15 DIV, labeled neurons presented a large cell body ( $>20\mu\text{m}$ ), positive ChAT immunostaining and a few processes that traveled long distances within the slice (Fig. 1 I,J). Regarding other neuronal types, the slices cultured in NB presented a well preserved distribution of calbindin positive neurons in the dorsal horn and clustered in the ventral horn (Fig. 2 A,B). Glial cells were also found widely distributed in the slice with astrocytes (GFAP positive), oligodendrocytes (MBP positive) and microglia (IB4 positive) showing no differences in their distribution between slices cultured in the different media (Fig. 2 C-H).

### **Glutamate-induced cell death in the spinal cord culture**

Glutamate caused a dose-dependent increase in cell death as revealed by EthD uptake, which enters into damaged cells and enhances its fluorescence by coupling to the nucleic acids (Moore, 1990) (Fig. 3 A-C). We considered that the maximum cell death and thus the maximum EthD uptake was obtained by submitting the slices to a cold stress, leaving them at  $4^{\circ}\text{C}$  for 24h (Fig. 3 D). In order to establish the contribution of NMDA or AMPA glutamate receptors to neuronal death in this model, we treated the slices with glutamate in the presence of the NMDA antagonist MK801 ( $10\ \mu\text{M}$ ) or the AMPA antagonist CNQX ( $30\ \mu\text{M}$ ). We observed that MK801 completely abolished glutamate toxicity whereas CNQX blocked it only partially (Fig. 3 E,F).

We then analyzed the effect of glutamate on MNs of the ventral horn. They presented a dose-dependent response to glutamate, with degenerating processes and cell bodies (Fig. 4 A-C). At a glutamate concentration of 30  $\mu\text{M}$  there was a decline of about one third in the number of SMI32-labeled MNs and almost complete neuronal death occurred with addition of glutamate at concentrations of 50 or 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 4 C,D). We observed complete blockade of the glutamate-induced neuronal death by the concomitant addition of MK801 and only a modest effect with CNQX (Figs. 4 D,E). These results indicate that glutamate neurotoxicity affects the overall survival of cells in the spinal cord slice and particularly of ventral horn MNs. Moreover, this toxicity seems to be predominantly mediated through activation of the glutamate NMDA receptor subtype.

### **Drug screening**

By using the same methodology, we performed a drug screening to ascertain the neuroprotective potential of MP, EPO, rolipram and riluzole against excitotoxicity on the spinal cord. The agents were individually added to the culture after 30 min of 50  $\mu\text{M}$  glutamate exposure; densitometric measurement of EthD uptake and counting the number of surviving MNs were performed 24 h and 48 h thereafter, respectively. Slices treated post-damage with different concentrations of EPO (0.15, 0.75, 1.5 and 7.5 U/ml) showed a significant reduction of EthD uptake only at 1.5 U/ml (EthD uptake  $43.3 \pm 0.7\%$ ,  $p < 0.05$  vs glutamate) (Fig. 5A). Thus at this concentration we estimated that EPO exert a protection of 72.8% of the overall spinal cord slice tissue. Regarding MNs particularly, EPO treatment at doses 1.5 and 7.5 U/ml was able to significantly rescue 72-78% MNs from glutamate excitotoxicity ( $p < 0.001$ ) (Fig. 5B). Injured spinal cord explants treated with doses of MP ranging from 0.01 to 100  $\mu\text{M}$  showed a significant reduction of EthD uptake compared with glutamate damaged explants (Fig. 5C). The highest reduction was found with 0.1  $\mu\text{M}$  MP (EthD uptake  $37.2 \pm 3.1\%$ ,  $p < 0.01$  vs. glutamate) at which it promoted 78.2% of tissue protection. The same dose was also the most efficient to increase MN viability ( $92 \pm 1\%$ ,  $p < 0.001$  vs. glutamate) (Fig. 5D). In injured cultures treated with rolipram (0.1 to 100  $\mu\text{M}$ ), the resulting percentage of EthD uptake showed an U-shaped dose-response (Fig. 5E). The maximal reduction of EthD uptake,  $34.2 \pm 5.0\%$  ( $p < 0.05$  vs. glutamate) was obtained with 10  $\mu\text{M}$  rolipram that promoted a 84.5 % of tissue protection. From 45 to 50% of MNs could be rescued from excitotoxicity in the explants by the addition of 0.1 to 1  $\mu\text{M}$  rolipram (Fig. 5F), with the best effect found at 1  $\mu\text{M}$ . Finally, regarding the effects of riluzole, EthD uptake in the injured explants was significantly

reduced by the addition of this drug at 1 and 10  $\mu\text{M}$  (EthD uptake 22.3%;  $p < 0.01$  vs glutamate) which promoted 87.0-98.0% of tissue protection (Fig. 5G). Riluzole showed a bell-shape dose-dependent MN protection effect, with the highest outcome at 1  $\mu\text{M}$  (85%,  $p < 0.001$ ).

These results indicate that MP, EPO, riluzole and rolipram were able to protect to some degree the spinal cord tissue and the MNs from excitotoxicity. Moreover, discrepancies between concentrations necessary to protect either the global parenchyma or specifically MNs existed for every drug assayed.

## DISCUSSION

The neurotoxicity derived from abnormal excitatory amino acid transmission in the central nervous system contributes to the neuronal loss in a variety of acute and chronic neurological disorders. Spinal MNs appear to be particularly vulnerable to glutamate-induced neurotoxicity (Estevez et al., 1995). Several neuroprotective drugs have been developed in attempts to break the excitotoxic loop that amplifies the damage and, thus to slow down the progression or limit the spread of neuronal and glial death (Doble, 1996). Among those neuroprotective drugs we have chosen MP, EPO, riluzole and rolipram to be comparatively tested in our model based on spinal cord cultured slices, since they have demonstrated effectiveness against excitotoxic insults and are already approved for human use.

### **In vitro model of spinal cord excitotoxicity**

Long-term functional deficits resulting from SCI are mainly due to white matter loss but also to segmental neuronal loss that contribute to the permanent motor impairments (Teng et al., 1999; Collazos-Castro et al., 2005; Garcia-Alias et al., 2006; Nakajima et al., 2007). Prevention of secondary parenchyma destruction and of neuronal death is of importance in order to minimize functional loss and eventually allow for reconnection of regenerating pathways. For this purpose, glutamate excitotoxicity, representing one of the earliest events of secondary injury (Tator and Fehlings, 1991; Lu et al., 2000; Sekhon and Fehlings, 2001) is a relevant target in drug screenings for therapy.

We have used an organotypic-based model to facilitate neuroprotective drug screening, as a preliminary study before *in vivo* testing of promising agents. The model presented herein is a modification of others previously described (Rothstein et al., 1993; Corse and Rothstein, 1995; Krassioukov et al., 2002; Lladó et al., 2004). This method, based on postnatal rat spinal cord explants, allows the use of a serum-free medium and a porous-membrane culture insert and preserves the main organizational features of the segmental spinal cord.

The use of NB serum-free medium enhanced MNs viability during the first 10 days in the spinal cord slices, although the number of viable MNs dropped between 7 and 15 DIV, reproducing the natural loss of 20% to 80% MNs that occurs early after birth (Tada et al., 1979; Rootman et al., 1981; Baulac and Meininger, 1983; Scarisbrick et al., 1990; Wetts and Vaughn, 1998). The fact that MNs can continue to mature during the culture has been previously suggested (Avossa et al., 2003; Avossa et al., 2006), this allows the use *in vitro*

of low concentrations of glutamate that better mimic the early supraphysiological levels found after SCI *in vivo* (Choi, 1988; Lipton and Rosenberg, 1994).

The methodology we have set up is based on both MNs specific survival analysis and spinal tissue preservation scrutiny; being the latter necessary to detect drugs that might reduce cavitation after SCI. In our system, we have observed that MK801, an NMDA receptor antagonist, abrogate cell death in both white and gray matter of the spinal cord suggesting that receptors present in glia also contribute to the overall excitotoxic damage. This is not unexpected since it has been recently reported the presence of NMDA receptors in astrocytes (Lalo et al., 2006) and oligodendrocytes (Karadottir et al., 2005; Salter and Fern, 2005; Micu et al., 2006). Oligodendrocytes are particularly sensitive to NMDA receptor dependent inward currents, which cause damage in soma and processes (Karadottir et al., 2005). In line with that, we have also obtained some tissue protection by blocking the AMPA receptor whose activation by glutamate in microglial cells leads to cytokine release, mainly tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), that also contribute to cell death (Merrill and Benveniste, 1996; Takahashi et al., 2003; Taylor et al., 2005).

### **Comparative analysis of neuroprotective drugs**

The comparative analysis of the neuroprotective effects of MP, EPO, riluzole and rolipram, against excitotoxicity on spinal cord slices indicates that all four drugs are able to effectively attenuate tissue damage and neuronal death, being riluzole the one that shows the overall best score. Riluzole treatment has been shown to improve recovery after experimental SCI (Schwartz & Fehlings, 2001; Ates et al, 2007), and in other experimental models of chronic or acute neurodegenerative diseases including ischemia (Malgouris et al., 1989; Pratt et al., 1992; Noh et al., 2000). Riluzole exerts anti-glutamatergic activity, inhibitory actions on various ion channels, has an antioxidant effect (Noh et al, 2000) and increases the expression of neurotrophic factors, such as BDNF and GDNF (Kato-Semba et al, 2002; Fumagalli et al, 2006). Our data suggest that relatively low concentrations of riluzole in organotypic spinal cord slices (1-10  $\mu$ M) are enough to prevent excitotoxic damage. A similar range of effectiveness was reported on other excitotoxic paradigms (Estevez et al., 1995), and the same concentration range potentiates glutamate uptake by astrocytes through unknown mechanisms *in vitro* (Frizzo et al., 2004). Thus, the synergistic effects of riluzole on astrocytes by enhancing glutamate uptake, and on neurons, by modulating NMDA-dependent ion influx through voltage-gated calcium and

sodium channels (Benoit & Escande, 1991; Debono et al., 1993; Hebert et al., 1994; Noh et al., 2000) may be responsible for the protective effects of riluzole in our model. This MN protection observed with riluzole, has been also reported on a model of ventral root avulsion (Nógrádi et al., 2007), in an in vivo model of ALS, the wobbler mouse (Fumagalli et al., 2006), and spinal cord ischemia (Lang-Lasdunski et al., 2000), although in the latter the drug was administrated before the induction of the injury. The tissue protection observed in our in vitro model is in agreement with that reported on SCI by Schwartz and Fehlings (2001), where administration of riluzole after the injury not only protected MNs, but also enhance the volume of spared white matter.

Among the other three drugs, MP and rolipram offer similar tissue preservation capacity but MP exerts better protection to MNs. The neural protection mediated by MP might be due to its capacity to inhibit expression of TNF- $\alpha$  and other cytokines (Xu et al., 1998; Gorio et al., 2005) as well as to reduce lipid peroxidation (Anderson et al., 1994). In contrast, rolipram exerts its action by specific inhibition of PDE4 that tightly regulates cAMP formed by stimulation of NMDA receptors (Suvarna & O'Donnell, 2002). In our system, this increment of cAMP does not seem enough to promote MN survival as much as with the other drugs assayed. However, rolipram action on glial cells may be sufficient to reduce spinal tissue damage, through mechanisms including prevention of oligodendrocyte excitotoxicity (Yoshioka et al., 2000), reduction of astrocytes and microglia proliferation (Zhang et al., 2002) and reactivity (Nikulina et al., 2004).

The administration of rolipram in spinal cord injuries show similar results to those here reported, it protects the white matter, and the major effect seems to be on the oligodendrocytes (Whitaker et al., 2008). Until now there are no reports on the direct effect of rolipram on the MNs protection after a SCI, but there are reports about the increase on axonal regeneration and overcoming of the inhibitory environment of the injury site (Nikulina et al., 2004; Hannila and Filbin, 2008). Recently has been reported similar results on white matter with MP, protecting oligodendrocytes after a SCI, observation that agrees with the results obtained with our in vitro model, but they also report that there isn't neuronal protection exerted by MP (Lee et al., 2008), although is reported that MP decreases apoptotic cell death of neurons and glia after a SCI (Vaquero et al., 2006). These differences on neurons preservation, can be due to the administration form of the drug, while in vivo is usually administrated in one bolus form, in vitro administration is continuous.

Finally, in the culture model the less effective neuroprotective drug used was EPO. One of the possible mechanisms for tissue protection mediated by EPO might be the inhibition of microglial activation and the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  (Villa et al., 2003). EPO inhibits neuronal phagocytosis (Chong et al., 2003a, b; Kang et al., 2003), and improves neurological recovery after brain trauma (Yatsiv et al., 2005). EPO-induced neuronal protection against excitotoxicity has been reported to be mediated through activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Digicaylioglu & Lipton, 2001) and by inducing BDNF and cAMP increases (Viviani et al., 2005).

The protective effect of EPO observed in the white and grey matter of our spinal cord cultures has been described in in vivo models of spinal cord injury, where the administration of EPO increases the amount of spare tissue (Gorio et al., 2002; King et al., 2007; Vitellaro-Zucarello et al., 2007), it is also able to rescue MNs death following axotomy (Iwasaki et al., 2002) and from an ischemic insult (Celik et al., 2002).

In this in vitro model of excitotoxic injury we also have tested the immunophilin ligand FK506. This drug treatment have shown a modest neuroprotective effect on MNs and a tissue protection of 31% (Guzman-Lenis et al, 2008). Drug treatments like cyclosporine A and geldanamycin have also shown a low protective effect on MNs but in contrast with FK506, these have no protective effect on the slice parenchyma (Guzman-Lenis et al, 2008).

Despite that all the drugs tested have been shown to provide some functional recovery and/or tissue preservation in animal models of SCI (Schwartz & Fehlings, 2001; Gorio et al., 2002; Nikulina et al., 2004; Ates et al., 2007; Okutan et al., 2007; Vitellaro-Zucarello et al., 2007), their neuroprotective effects had not been compared in the same injury system.

Our results indicate that riluzole may be the drug that exerts the highest overall spinal cord tissue preservation, with particular protection on MNs. Moreover, future combinations with the agents resulted from such screening can be designed. For instance, from the present study, we envisaged the use of MP together with riluzole to obtain better tissue and MN protection. Indeed, Mu and collaborators already reported that this combination shed better functional recovery than single treatments in animal models of SCI (Mu et al., 2000). Nevertheless, before choosing a particular drug for future studies in vivo, other considerations should be taken into account, particularly the bioavailability and the possible side effects in the organism. For instance, in spite of its good behavior in culture, MP does not easily cross the blood-brain barrier due to the active opposition of P-

glycoprotein present in endothelial cells (Koszdin et al., 2000), so high doses need to be administered that induce systemic immunosuppression. Rolipram has also immunosuppressive effects (Nikulina et al., 2004). EPO treatment requires a minimum effective dose that is higher than those currently used for treatment of anaemia. The acute use of EPO is not likely to be harmful, but its chronic administration increases the erythrocyte mass and this could worsen the injury by causing changes in the blood flow (Ghezzi & Brines, 2004). To avoid EPO undesirable effects, molecules that retain the protective actions of EPO but not its haematopoietic effects, like carbamylated EPO (CEPO) and asialo-EPO (Mennini et al., 2006; Montero et al., 2007) are currently being tested.

The in vitro model presented herein may serve for initial screening and comparative analysis of numerous drug to narrow the choice for future neuroprotective agents to be used after injury in order to alleviate the devastating effects of SCI and neurodegenerative insults, and to investigate their molecular and pathway mechanisms of action.



**Acknowledgments**

This research was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2006-08682), and the Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060201) of Spain, the European Commission (Marie-Curie Reintegration Grant, MERG-CT-2004-006381) and FEDER funds. CC was recipient of a Juan de la Cierva fellowship.

**REFERENCES**

- Adamchik Y, Frantseva MV, Weisspapir M, Carlen PL, Perez Velazquez, JL (2000) Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Protoc* **5**: 153-158.
- Albin MS, White RJ, Acosta-Rua G, Yashon D (1968) Study of functional recovery produced by delayed localized cooling after spinal cord injury in primates. *J Neurosurg* **29**: 113-120.
- Allen A (1914) Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *J. Nerv. Ment. Dis* **41**: 141-147.
- Anderson, D.K., Dugan, L.L., Means, E.D. & Horrocks, L.A. (1994). Methylprednisolone and membrane properties of primary cultures of mouse spinal cord. *Brain Res.*, **637**, 119-125.
- Andersson, O., Stenqvist, A., Attersand, A. & Von Euler, G. (2001) Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics*, **78**, 178-84.
- Annis, C.M., Edmon, J. & Robertson, R.T. (1990) A chemically-defined medium for organotypic slice cultures. *J Neurosci Methods.*, **32**, 63-70.
- Ates, O., Cayli, S.R., Gurses, I., Turkoz, Y., Tarim, O., Cakir, C. O. & Kocak, A. (2007) Comparative neuroprotective effect of sodium channel blockers after experimental spinal cord injury. *J Clin Neurosci.*, **14**, 658-665.
- Avossa, D., Rosato-Siri, M.D., Mazzarol, F. & Ballerini, L. (2003) Spinal circuits formation: a study of developmentally regulated markers in organotypic cultures of embryonic mouse spinal cord. *Neuroscience*, **122**, 391-405.
- Avossa, D., Grandolfo, M., Mazzarol, F., Zatta, M., Ballerini, L. (2006) Early signs of motoneuron vulnerability in a disease model system: Characterization of transverse slice cultures of spinal cord isolated from embryonic ALS mice. *Neuroscience*, **138**, 1179-1194.
- Baker, R.E. & Janzen, D.G. (1989) Non-selective afferent innervation develops in embryonic mouse spinal cord-dorsal root ganglia explants chronically exposed to GM1 ganglioside. *Int J Dev Neurosci.*, **7**, 87-92.
- Baker, R.E., Guérol, B. & Dreyfus H. (1989) Gangliosides of the mouse spinal cord: a comparison in vivo and in vitro tissues. *Int J Dev Neurosci.*, **7**, 93-101.
- Baptiste, D.C. & Fehlings, M.G. (2007). Update on the treatment of spinal cord injury. *Prog Brain Res.*, **161**, 217-233.

- Bär, P.R. (2000) Motor neuron disease in vitro: the use of cultured motor neurons to study amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Pharmacol.*, **405**: 285-95.
- Barber, R.P., Phelps, P.E. & Vaughn, J.E. (1993) Preganglionic autonomic motor neurons display normal translocation patterns in slice cultures of embryonic rat spinal cord. *J Neurosci.*, **13**, 4898-907.
- Basso, D.M., Beattie, M.S. & Bresnahan, J.C. (1996) Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol.*, **139**, 244-56.
- Baulac, M., Meininger, V. (18983) Postnatal development and cell death in the sciatic motor nucleus of the mouse. *Exp. Brain Res.*, **50**, 107-116,
- Benoit, E. & Escande, D., (1991) Riluzole specifically blocks inactivated Na channels in myelinated nerve fibre. *Pflugers Arch.*, **419**, 603-609.
- Bernards, C. M. & Akers, T. (2006) Effect of postinjury intravenous or intrathecal methylprednisolone on spinal cord excitatory amino-acid release, nitric oxide generation, PGE2 synthesis, and myeloperoxidase content in a pig model of acute spinal cord injury. *Spinal Cord*, **44**, 594-604.
- Bernaudin, M., Marti, H.H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E.T. & Petit, E. (1999) A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.*, **19**, 643-651.
- Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q.W., Smart, J., Su-Rick, C.J., Pobre, E, Diaz, D., Gomez, D., Hand, C., Coleman, T. & Cerami, A. (2004) Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **101**, 14907-14912.
- Carriedo, S.G., Yin, H.Z., Sensi, S.L. & Weiss, J.H. (1998) Rapid Ca<sup>2+</sup> entry through Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA/Kainate channels triggers marked intracellular Ca<sup>2+</sup> rises and consequent oxygen radical production. *J Neurosci.*, **18**, 7727-7738.
- Carriedo, S.G., Yin, H.Z. & Weiss, J.H. (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci.*, **16**: 4069-79.
- Carriedo, S.G., Sensi, S.L., Yin, H.Z. & Weiss, J.H. (2000) AMPA exposures induce mitochondrial Ca(2+) overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci.*, **20**: 240-50.
- Celik, M., Gokmen, N., Erbayraktar, S., Akhisaroglu, M., Konakc, S., Ulukus, C., Genc, S., Genc, K., Sagiroglu, E., Cerami, A., Brines, M. (2002) Erythropoietin prevents

- motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99**, 2258-2263.
- Chatterton, J.E., Awobuluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S.A. & Zhang, D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, **415**, 793-8.
- Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, **1**, 623-34.
- Ciabarra, A.M., Sullivan, J.M., Gahn, L.G., Pecht, G., Heinemann, S. & Sevarino, K.A. (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci.*, **15**, 6498-508.
- Collazos-Castro, J.E., Soto, V.M., Gutierrez-Davila, M. & Nieto-Sampedro, M. (2005) Motoneuron loss associated with chronic locomotion impairments after spinal cord contusion in the rat. *J Neurotrauma.*, **22**, 544-558.
- Corse, A.M. & Rothstein, J.D. (1995) Organotypic spinal cord cultures and a model of chronic glutamate-mediated motor neuron degeneration. In Ohnishi ST, Ohnishi E. (eds), *Central Nervous System Trauma Research Techniques*. CRC Press: New York, pp. 341–51.
- Corse, A.M., Bilak, M.M., Bilak, S.R, Lehar, M., Rothstein, J.D. & Kunel, L.W. (1999) Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis.*, **6**, 335-46.
- Crain, S.M. & Peterson, E.R. (1963) Bioelectric activity in long-term cultures of spinal cord tissues. *Science*, **141**, 427-9.
- Crain, S.M. & Peterson, E.R. (1967) Onset and development of functional interneuronal connections in explants of rat spinal cord-ganglia during maturation in culture. *Brain Res.*, **6**, 750-62.
- Curt, A. & Dietz, V. (1996) Neurographic assessment of intramedullary motoneurone lesions in cervical spinal cord injury: consequences for hand function. *Spinal Cord*. **34**, 326-332.
- Chong, Z.Z., Kang, J.Q. & Maiese, K. (2003a). Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol.*, **38**, 1107-1118.

- Chong, Z.Z., Lin, S.H., Kang, J.Q. & Maiese, K. (2003b) Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *J Neurosci Res.*, **71**, 659-669.
- Debono, M W., Le Guern, J., Canton, T., Doble, A. & Pradier, L. (1993) Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol.*, **235**, 283-289.
- Delfs, J., Friend, J., Ishimoto. S. & Saroff, D. (1989) Ventral and dorsal horn acetylcholinesterase neurons are maintained in organotypic cultures of postnatal rat spinal cord explants. *Brain Res.*, **488**: 31-42.
- Digicaylioglu, M., Bichet, S., Marti, H.H., Wenger, R.H., Rivas, L.A., Bauer, C. & Gassmann, M. (1995) Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **92**, 3717-3720.
- Digicaylioglu, M. & Lipton, S. A., (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*, **412**, 641-647.
- Estevez, A.G., Stutzmann, J.M. & Barbeito, L. (1995) Protective effect of riluzole on excitatory amino acid-mediated neurotoxicity in motoneuron-enriched cultures. *Eur J Pharmacol.*, **280**, 47-53.
- Faden, A.I., Lemke, M., Simon, R.P. & Noble, L.J. (1988) N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic, and neurochemical studies. *J Neurotrauma*, **5**, 33-45.
- Frantseva, M.V., Carlen, P.L. & El-Beheiry, H. (2004) A submersion method to induce hypoxic damage in organotypic hippocampal cultures. *J Neurosci Methods*, **89**, 25-31.
- Frizzo, M.E., Dall'Onder, L.P., Dalcin, K.B. & Souza, D.O. (2004) Riluzole enhances glutamate uptake in rat astrocyte cultures. *Cell Mol Neurobiol.*, **24**, 123-128.
- Fryer, H.J., Knox, R.J., Strittmatter, S.M. & Kalb, R.G. (1999) Excitotoxic death of a subset of embryonic rat motor neurons in vitro. *J Neurochem*, **72**, 500-13.
- Fryer, H.J., Wolf, D.H., Knox, R.J., Strittmatter, S.M., Pennica, D., O'Leary, R.M., Russell, D.S. & Kalb, R.G. (2000) Brain-derived neurotrophic factor induces excitotoxic sensitivity in cultured embryonic rat spinal motor neurons through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Neurochem.*, **74**, 582-95.
- Fukaya, M., Hayashi, Y. & Watanabe, M. (2005) NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. *Eur J Neurosci.*, **21**, 1432-6.

- Fumagalli, E., Bigini, P., Barbera, S., De Paola, M. & Mennini, T. (2006) Riluzole, unlike the AMPA antagonist RPR119990, reduces motor impairment and partially prevents motoneuron death in the wobbler mouse, a model of neurodegenerative disease. *Exp Neurol.*, **198**, 114-128.
- Gahwiler, B.H. (1981) Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, **4**, 329-42.
- Gahwiler, B.H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R.A. & Thompson, S.M. (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.*, **20**, 471-7.
- Garcia-Alias, G., Valero-Cabre, A., Lopez-Vales, R., Fores, J., Verdu, E. & Navarro, X. (2006) Differential motor and electrophysiological outcome in rats with mid-thoracic or high lumbar incomplete spinal cord injuries. *Brain Res.*, **1108**, 195-204.
- Gensel, J.C., Tovar, C.A., Hamers, F.P., Deibert, R.J., Beattie, M.S. & Bresnahan, J.C. (2006) Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. *J Neurotrauma*, **23**, 36-54.
- Ghezzi, P. & Brines, M. (2004) Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ.*, **11** Suppl 1:S37-44.
- Glazer, A.N., Peck, M. & Mathies, R.A. (1990) A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: application to picogram fluorescence detection of DNA in agarose gels. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **87**, 3851-5.
- Greig, A., Donevan, S.D., Mujtaba, T.J. & Parks, T.N. (2000) Rao MS. Characterization of the AMPA-activated receptors present on motoneurons. *J Neurochem.*, **74**, 179-91.
- Gorio, A., Gokmen, N., Erbayraktar, S., Yilmaz, O., Madaschi, L., Cichetti, C., Di Giulio, A. M., Vardar, E., Cerami, A. & Brines, M. (2002) Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 9450-9455.
- Gorio, A., Madaschi, L., Di Stefano, B., Carelli, S., Di Giulio, A. M., De Biasi, S., Coleman, T., Cerami, A. & Brines, M. (2005) Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **102**, 16379-16384.
- Guzman-Lenis, M.S., Vallejo, C., Navarro, X., Casas, C. (2008) Analysis of FK506-mediated protection in an organotypic model of spinal cord damage: Heat shock protein 70 levels are modulated in microglial cells. *Neuroscience*.

- Hall, E.D. & Braugher, J.M. (1982) Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and (Na + + K + )-ATPase activity. Dose-response analysis during 1st hour after contusion injury in the cat. *J Neurosurg.*, **57**, 247–253.
- Hannila, S.S., Filbin, M.T. (2008) The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Exp.Neurol.*, **209**, 321-332.
- Hebert, T., Drapeau, P., Pradier, L. & Dunn, R. J. (1994) Block of the rat brain IIA sodium channel alpha subunit by the neuroprotective drug riluzole. *Mol Pharmacol.*, **45**, 1055-1060.
- Iwasaki, Y., Ikeda, K., Ichikawa, Y., Igarashi, O., Iwamoto, K., Kinoshita, M. (2002) Protective effect of interleukin-3 and erythropoietin on motor neuron death after neonatal axotomy. *Neurol.Res.*, **24**, 643-646.
- Kalb, R.G. (1994) Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. *Development*, **120**: 3063-71.
- Kang, J.Q., Chong, Z.Z. & Maiese, K. (2003) Akt1 protects against inflammatory microglial activation through maintenance of membrane asymmetry and modulation of cysteine protease activity. *J Neurosci Res.*, **74**, 37-51.
- Karadottir, R., Cavelier, P., Bergersen, L.H. & Attwell, D. (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*, **438**, 1162-1166.
- King, V.R., Averill, S.A., Hewazy, D., Priestley, J.V., Torup, L., Michael-Titus, A.T. (2007) Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. *Eur.J.Neurosci.*, **26**, 90-100.
- Koszdin, K.L., Shen, D.D. & Bernards, C.M. (2000) Spinal cord bioavailability of methylprednisolone after intravenous and intrathecal administration: the role of P-glycoprotein. *Anesthesiology*, **92**, 156-163.
- Krassioukov, A.V., Ackery, A., Schwartz, G., Adamchik, Y., Liu, Y. & Fehlings, M.G. (2002) An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. *Brain Res Protoc.*, **10**, 60-8.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A. & Verkhratsky, A. (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci.*, **26**, 2673-2683.
- Lang-Lazdunski, L., Heurteaux, C., Vaillant, N., Widmann, C., Lazdunski, M. (1999) Riluzole prevents ischemic spinal cord injury caused by aortic crossclamping. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, **117**, 881-889.

- Lang-Lazdunski, L., Heurteaux, C., Dupont, H., Widmann, C., Lazdunski, M. (2000) Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effects of magnesium sulfate and riluzole. *J.Vasc.Surg.*, **32**, 179-189.
- Lee, J.M., Yan, P., Xiao, Q., Chen, S., Lee, K.Y., Hsu, C.Y., Xu, J. (2008) Methylprednisolone protects oligodendrocytes but not neurons after spinal cord injury. *J.Neurosci.*, **28**, 3141-3149.
- Lipton, S.A. & Rosenberg, P.A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.*, **330**, 613-622.
- Lladó, J., Haenggeli, C., Maragakis, N.J., Snyder, E.Y. & Rothstein, J. (2004) Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci.*, **27**, 322-31.
- Lu, V.B., Moran, T.D., Balasubramanian, S., Alier, K.A., Dryden, W.F., Colmers, W.F., Smith, P.A. (2006) Substantia Gelatinosa neurons in defined-medium organotypic slice culture are similar to those in acute slices from young adult rats. *Pain*, **121**, 261-275.
- Lu, J., Ashwell, K.W. & Waite, P. (2000) Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*, **25**, 1859-1866.
- Malgouris, C., Bardot, F., Daniel, M., Pellis, F., Rataud, J., Uzan, A., Blanchard, J. C. & Laduron, P.M. (1989) Riluzole, a novel antiglutamate, prevents memory loss and hippocampal neuronal damage in ischemic gerbils. *J Neurosci.*, **9**, 3720-3727.
- Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S. & Yuzaki, M. (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res.*, **100**, 43-52.
- Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y. & Yuzaki, M. (2003) Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *J Neurosci.*, **23**, 10064-10073.
- Mennini, T., De Paola, M., Bigini, P., Mastrotto, C., Fumagalli, E., Barbera, S., Mengozzi, M., Viviani, B., Corsini, E., Marinovich, M., Torup, L., Van Beek, J., Leist, M., Brines, M., Cerami, A. & Ghezzi, P. (2006) Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo. *Mol Med.*, **12**, 153-160.
- Merrill, J.E. & Benveniste, E.N. (1996). Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci.*, **19**, 331-338.



- Metz, G A., Curt, A., van de Meent, H., Klusman, I., Schwab, M.E. & Dietz, V. (2000) Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *J Neurotrauma*, **17**, 1-17.
- Metzger, F., Wiese, S.& Sendtner, M. (1998) Effect of glutamate on dendritic growth in embryonic rat motoneurons. *J Neurosci.*,**18**, 1735-42.
- Metzger, F., Klapproth, N., Kulik, A., Sendtner, M., Ballanyi, K. (2005) Optical assessment of motoneuron function in a "twenty-four-hour", acute spinal cord slice model from fetal rats. *J Neurosci Methods*, **141**, 309-20.
- Micu, I., Jiang, Q., Coderre, E., Ridsdale, A., Zhang, L., Woulfe, J., Yin, X., Trapp, B.D., McRory, J.E., Rehak, R., Zamponi, G.W., Wang, W. & Stys, P.K. (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature*, **439**, 988-992.
- Milhorat, T.H., Capocelli, A.L., Jr., Anzil, A.P., Kotzen, R.M. & Milhorat, R.H. (1995) Pathological basis of spinal cord cavitation in syringomyelia: analysis of 105 autopsy cases. *J Neurosurg.*, **82**, 802-812.
- Monette, R., Small, D., Mealing, G. & Morley, P. (1998) A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res Protoc.*, **2**, 99-108.
- Montero, M., Poulsen, F.R., Norberg, J., Kirkeby, A., van Beek, J., Leist, M. & Zimmer, J. (2007) Comparison of neuroprotective effects of erythropoietin (EPO) and carbamylerythropoietin (CEPO) against ischemia-like oxygen-glucose deprivation (OGD) and NMDA excitotoxicity in mouse hippocampal slice cultures. *Exp Neurol.*, **204**, 106-117.
- Moore, P.L., MacCoubrey, I.C. & Haugland, R.P. (1990) A rapid, pH insensitive, two color fluorescence viability (cytotoxicity) assay. *J Cell Biol.*, **111**, [Abstract No. 304].
- Mori, H. & Mishina, M. (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, **34**, 1219-37.
- Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y. & Sasaki, R. (1997) Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*, **76**, 105-116.
- Mu, X., Azbill, R.D. & Springer, J.E. (2000) Riluzole and methylprednisolone combined treatment improves functional recovery in traumatic spinal cord injury. *J neurotrauma*, **17**, 773-780.

- Nakajima, H., Uchida, K., Kobayashi, S., Inukai, T., Horiuchi, Y., Yayama, T., Sato, R. & Baba, H. (2007) Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene. *J Neurotrauma*, **24**, 703-712.
- Nakanishi, S. & Masu, M. (1994) Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, **23**, 319-348.
- Nikulina, E., Tidwell, J.L., Dai, H.N., Bregman, B.S. & Filbin, M.T. (2004) The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **101**, 8786-8790.
- Nishi, M., Hinds, H., Lu, H.P., Kawata, M. & Hayashi, Y. (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci.*, **21**, RC185.
- Noble, L.J. & Wrathall, J.R.. (1985) Spinal cord contusion in the rat: morphometric analyses of alterations in the spinal cord. *Exp Neurol.*, **88**, 135-149.
- Noh, K.M., Hwang, J.Y., Shin, H.C. & Koh, J.Y. (2000) A novel neuroprotective mechanism of riluzole: direct inhibition of protein kinase C. *Neurobiol Dis.*, **7**, 375-383.
- Nogradi, A., Szabo, A., Pinter, S., Vrbova, G. (2007) Delayed riluzole treatment is able to rescue injured rat spinal motoneurons. *Neuroscience*, **144**, 431-438.
- Okutan, O., Solaroglu, I., Beskonakli, E. & Taskin, Y. (2007) Recombinant human erythropoietin decreases myeloperoxidase and caspase-3 activity and improves early functional results after spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci.*, **14**, 364-368.
- Oppenheim, RW. (1989) The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death in the brachial and lumbar spinal cord of the rat. *Trends Neurosci.*, **12**, 252-255.
- Owen, A.D. & Bird, M.M. (1997) Role of glutamate in the regulation of the outgrowth and motility of neurites from mouse spinal cord neurons in culture. *J Anat.*, **191**, 301-307.
- Pratt, J., Rataud, J., Bardot, F., Roux, M., Blanchard, J.C., Laduron, P.M. & Stutzmann, J.M. (1992). Neuroprotective actions of riluzole in rodent models of global and focal cerebral ischaemia. *Neurosci Lett.*, **140**, 225-230.
- Rakowics, W.P., Staples, C.S., Milbrandt, J., Brunstrom, J.E. & Johnson, E.M. (2002) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival of early postnatal spinal motor neurons in the lateral and medial motor columns in slice culture. *J Neurosci.*, **22**, 3953-3962.

- Regan, R.F. & Choi, D.W. (1991) Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell culture. *Neuroscience*, **43**, 585-591.
- Rootman, D.S., Tatton, W.G. & Hay, M. (1981) Postnatal histogenic death of rat forelimb motoneurons. *J Comp Neurol.*, **199**, 17-27.
- 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.
- Rösner, H. & Vacuum, G. (1997) Organotypic spinal cord culture in serum-free fibrin gel: a new approach to study three-dimensional neurite outgrowth and of neurotoxicity testing. Effects of modulating the actin and tubulin dynamics and protein kinase activities. *J Neurosci Methods*, **78**, 93-103.
- Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S., Masuda, S. & Sasaki, R. (1998) Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun.*, **253**, 26-32.
- Salter, M.G. & Fern, R. (2005). NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature*, **438**, 1167-1171.
- Scarlsbrick, I.A., Haase, P. & Hrycshyn, A.W. (1990) The arrangement of forearm motoneurons in young and adult rats and the possibility of natural occurring motoneuron death. *J Anat.*, **171**, 57-67.
- Schwartz, G. & Fehlings, M.G. (2001) Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J Neurosurg.*, **94**, 245-256.
- Seeburg, P.H. (1993) The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.*, **16**, 359-365.
- Sekhon, L.H. & Fehlings, M.G. (2001) Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, **26**, S2-12.
- Stavridis, S.I., Dehghani, F., Korf, H.W. & Hailer, N.P. (2005) Characterisation of transverse slice culture preparations of postnatal rat spinal cord: preservation of defined neuronal populations. *Histochem Cell Biol.*, **123**, 377-392.
- Stoppini, L., Buchs, P.A. & Muller, D. (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, **37**, 173-182.
- Sucher, N.J., Akbarian, S., Chi, C.L., Leclerc, C.L., Awobuluyi, M., Deitcher, D.L., Wu, M.K., Yuan, J.P., Jones, E.G. & Lipton, S.A. (1995) Developmental and regional

- expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci.*, **15**, 6509-6520.
- Sugawa, M., Sakurai, Y., Ishikawa-Ieda, Y., Suzuki, H. & Asou, H., (2002) Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res.*, **44**, 391-403.
- Suvarna, N.U. & O'Donnell, J.M. (2002) Hydrolysis of N-methyl-D-aspartate receptor-stimulated cAMP and cGMP by PDE4 and PDE2 phosphodiesterases in primary neuronal cultures of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther.*, **302**, 249-256.
- Tada, K., Ohshita, S., Yonenobu, K., Ono, K., Satoh, K., Shimizu, N. (1979) Experimental study of spinal nerve repair after plexus brachialis injury in newborn rats: a horseradish peroxidase study. *Exp.Neurol.*, **65**, 301-314.
- Takahashi, J.L., Giuliani, F., Power, C., Imai, Y. & Yong, V.W. (2003) Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann Neurol.*, **53**, 588-595.
- Taoka, Y., Okajima, K., Uchiba, M. & Johno, M. (2001) Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J Neurotrauma*, **18**, 533-543.
- Tator, C.H. & Fehlings, M.G. (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.*, **75**, 15-26.
- Taylor, D.L., Jones, F., Kubota, E.S. & Pocock, J.M. (2005) Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor alpha-induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *J Neurosci.*, **25**, 2952-2964.
- Teng, Y.D., Mocchetti, I., Taveira-DaSilva, A.M., Gillis, R.A. & Wrathall, J.R. (1999) Basic fibroblast growth factor increases long-term survival of spinal motor neurons and improves respiratory function after experimental spinal cord injury. *J Neurosci.*, **19**, 7037-7047.
- Terro, F., Yardin, C., Esclaire, F., Ayer-Lelievre, C., Hugon, J. (1998) Mild kainate toxicity produces selective motoneuron death with marked activation of CA(2+)-permeable AMPA/kainate receptors. *Brain Res.*, **809**, 319-324.
- Thomas, C.K., Zaidner, E.Y., Calancie, B., Broton, J.G. and Bigland-Ritchie, B.R. (1997) Muscle weakness, paralysis, and atrophy after human cervical spinal cord injury. *Exp Neurol.*, **148**, 414-423.

- Tsang, Y.M., Chiong, F., Kuznetsov, D., Kasarskis, E., Geula, C. (2000) Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *Brain Res.*, **861**, 45-58.
- Tymianski, M., Charlton, M.P., Carlen, P.L. & Tator, C.H. (1993a) Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci.*, **13**, 2085-2104.
- Tymianski, M., Charlton, M.P., Carlen, P.L. & Tator, C.H. (1993b) Secondary Ca<sup>2+</sup> overload indicates early neuronal injury which precedes staining with viability indicators. *Brain Res*, 1993b; 607: 319-23.
- Vajda, F. J. (2002) Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci.*, **9**, 4-8.
- Vaquero, J., Zurita, M., Oya, S., Aguayo, C., Bonilla, C. (2006) Early administration of methylprednisolone decreases apoptotic cell death after spinal cord injury. *Histol.Histopathol.*, **21**, 1091-1102.
- Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A., Viviani, B., Marinovich, M., Cerami, A., Coleman, T.R., Brines, M. & Ghezzi, P. (2003) Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med.*, **198**, 971-975.
- Vitellaro-Zuccarello, L., Mazzetti, S., Madaschi, L., Bosisio, P., Gorio, A. & De Biasi, S., (2007) Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience*, **144**, 865-877.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Corsini, E., Villa, P., Ghezzi, P., Garau, A., Galli, C.L. & Marinovich, M. (2005) Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem.* **93**, 412-421.
- Wada, S., Yone, K., Ishidou, Y., Nagamine, T., Nakahara, S., Niiyama, T., Sakou, T. (1999) Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg.*, **91**, 98-104.
- Wetts, R. & Vaughn, J.E. (1998) Differences in developmental cell death between somatic and autonomic motor neurons of rat spinal cord. *J Comp Neurol.*, **396**, 483-492.
- Whitaker, C.M., Beaumont, E., Wells, M.J., Magnuson, D.S., Hetman, M., Onifer, S.M. (2008) Rolipram attenuates acute oligodendrocyte death in the adult rat ventrolateral funiculus following contusive cervical spinal cord injury. *Neurosci.Lett.*, **438**, 200-204.

- Xu, J., Fan, G., Chen, S., Wu, Y., Xu, X.M. & Hsu, C.Y. (1998) Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res Mol Brain Res.*, **59**, 135-142.
- Yatsiv, I., Grigoriadis, N., Simeonidou, C., Stahel, P.F., Schmidt, O.I., Alexandrovitch, A.G., Tsenter, J. & Shohami, E. (2005) Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J.*, **19**, 1701-1703.
- Yoshioka, A., Yamaya, Y., Saiki, S. & Kanemoto, M., Hirose, G. & Pleasure, D. (2000) Cyclic GMP/cyclic GMP-dependent protein kinase system prevents excitotoxicity in an immortalized oligodendroglial cell line. *J Neurochem.*, **74**, 633-640.
- Zhang, B., Yang, L., Konishi, Y., Maeda, N., Sakanaka, M. & Tanaka, J., (2002) Suppressive effects of phosphodiesterase type IV inhibitors on rat cultured microglial cells: comparison with other types of cAMP-elevating agents. *Neuropharmacology*, **42**, 262-269.
- Zhang, J., Li, Y., Cui, Y., Chen, J., Lu, M., Elias, S.B. & Chopp, M. (2005) Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Brain Res.*, **1034**, 34-39.

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Representative microphotography of the explants in phase contrast (A) indicating the frame of immunohistochemical analysis, and stained with cresyl violet (B). Fluorescent microphotographs of slice halves showing the distribution of MNs labeled with the SMI32 antibody after culture in either MEM/serum-based (MEM) or in neurobasal-based medium (NB) at 7 DIV (C,D), 10 DIV (E,F) and 15 DIV (G,H). ChAT-positive MNs on spinal cord slices at 15 DIV in MEM (I) and in NB (J) media. Scale bars are 200  $\mu\text{m}$  in A, 100  $\mu\text{m}$  in B-H and 50  $\mu\text{m}$  in I-J. At the bottom, histogram of the average numbers of SMI32-positive cells, showing significant differences in the explants cultured in the different media at 10 DIV (n=16-32), (\* P<0.001 vs MEM).

Fig. 2. Fluorescent microphotographs of the spinal cord slices showing regional distribution and detail of neurons stained for calbindin, at low (A) and high magnification (B), astrocytes stained for GFAP at low (C) and high magnification (D), microglia stained against IB4 at low (E) and high magnification (F) and oligodendrocytes stained for MBP at low (G) and high magnification (H). Scale bar = 200  $\mu\text{m}$  in A, C, E and G; 20  $\mu\text{m}$  in B, D, F and H.

Fig. 3. Representative masked fluorescent microphotographs showing EthD uptake in whole spinal cord slice cultures untreated (A), and exposed to 50  $\mu\text{M}$  (B) and 100  $\mu\text{M}$  (C) glutamate, submitted to cold stress (D), or exposed to 50  $\mu\text{M}$  glutamate plus 10  $\mu\text{M}$  MK801 (E) or plus 30  $\mu\text{M}$  CNQX (F). At the bottom, histogram representing the percentage of EthD uptake under the different treatments and in controls (C) (n=16-32), (\*P<0.001). The scale intensity of EthD uptake is shown at the right of each photograph. Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 4. Fluorescent microphotographs of large ventral SMI32-positive MNs surviving in untreated spinal cord slices (A), after addition of 30  $\mu\text{M}$  (B) and 50  $\mu\text{M}$  glutamate (C), and after addition of 50  $\mu\text{M}$  glutamate with 10  $\mu\text{M}$  MK801 (D) or with 30  $\mu\text{M}$  CNQX (E). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . Histogram showing differences of average number  $\pm$  SEM of SMI32-positive cells surviving in the slices at the different conditions compared to untreated controls (C) or to 50  $\mu\text{M}$  glutamate treatment (bottom) (n=16-32). (\*P<0.05, \*\*P<0.001).

Fig. 5. Histograms showing the average percentage  $\pm$  SEM of EthD uptake (A, C, E, G) and the average number of SMI32-positive MNs surviving in the injured slices (B, D, F, H) following treatment with EPO, (A, B), MP (C, D), rolipram (E, F) and riluzole (G, H) at the different concentrations tested, compared to not injured untreated controls (C) ( $\#P<0.05$ ;  $\#\#P<0.001$ ;  $\#\#\#P<0.0001$ ).and to 50  $\mu$ M glutamate treatment alone (G) ( $*P<0.05$ ;  $**P<0.001$ ;  $***P<0.0001$ ).



Figure 1

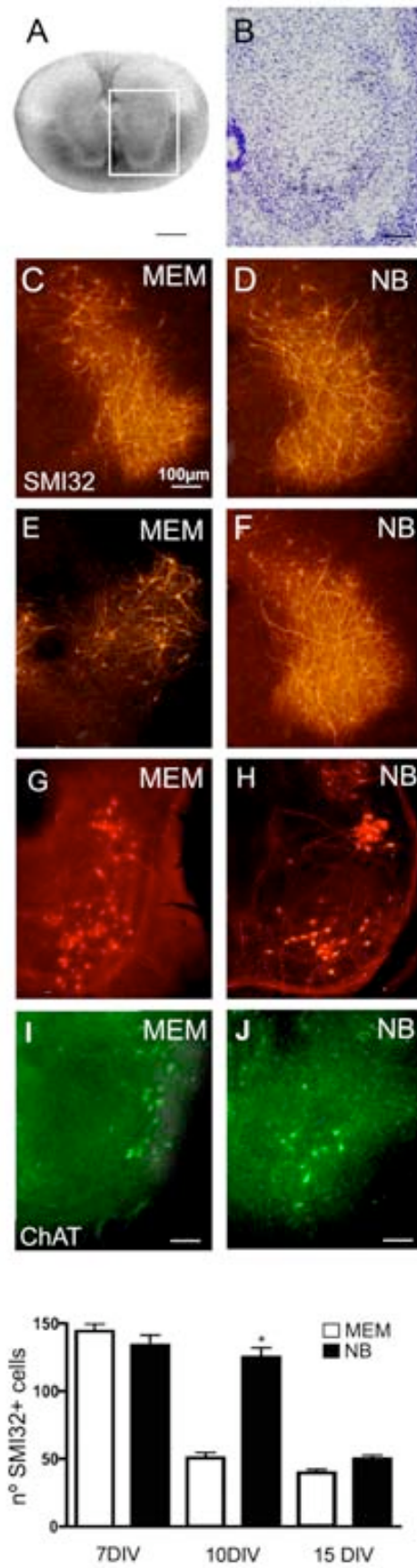


Figure 2

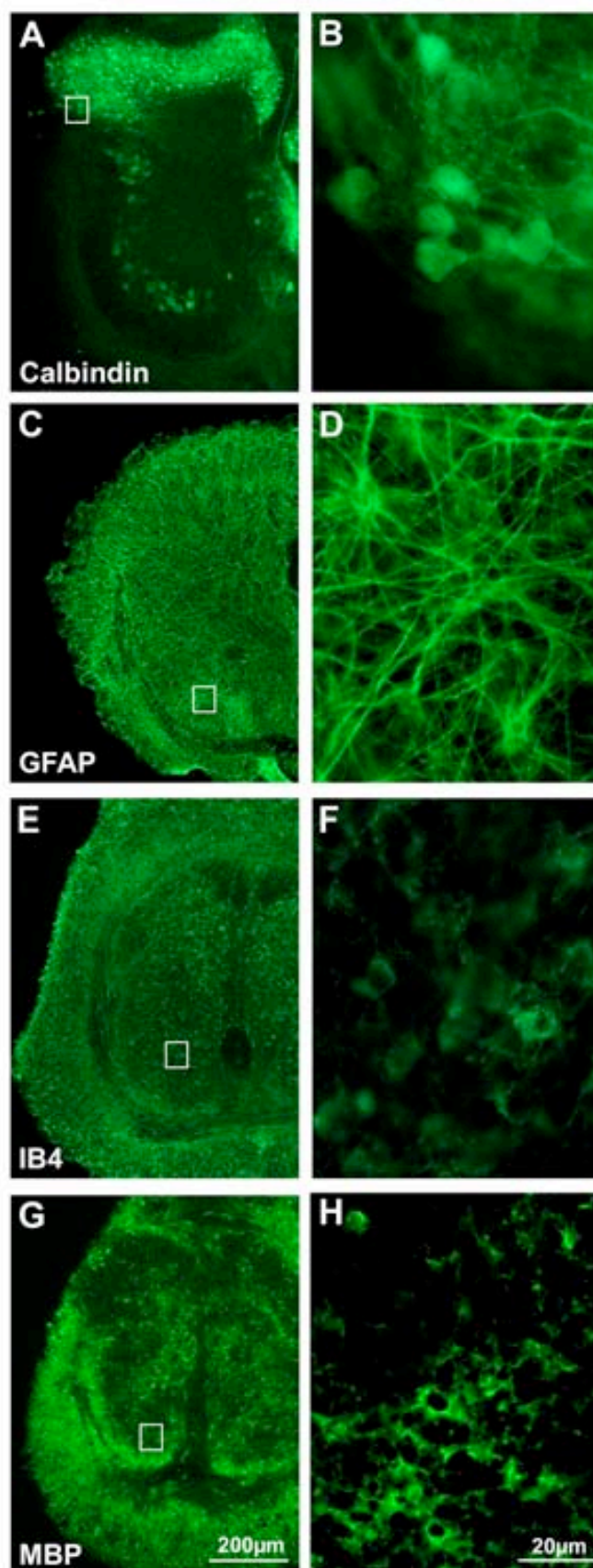


Figure 3

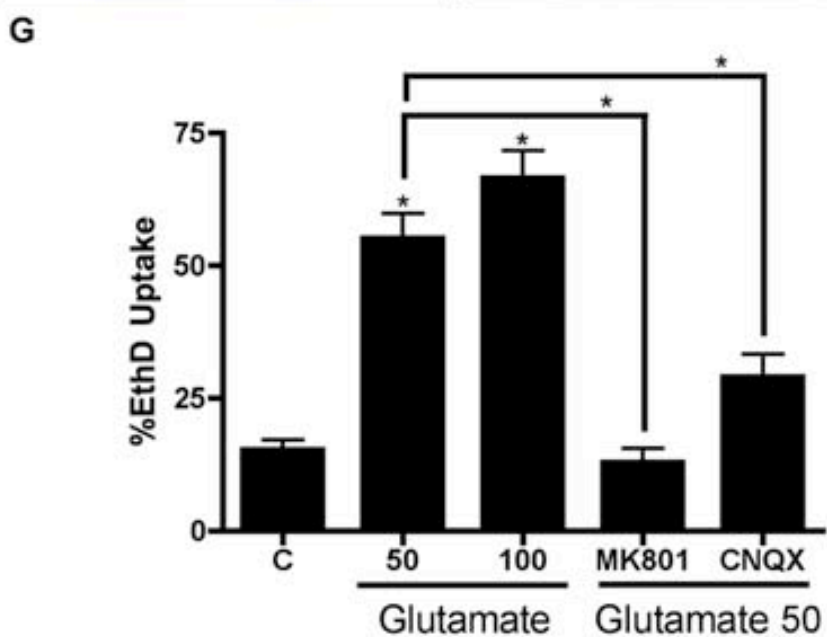
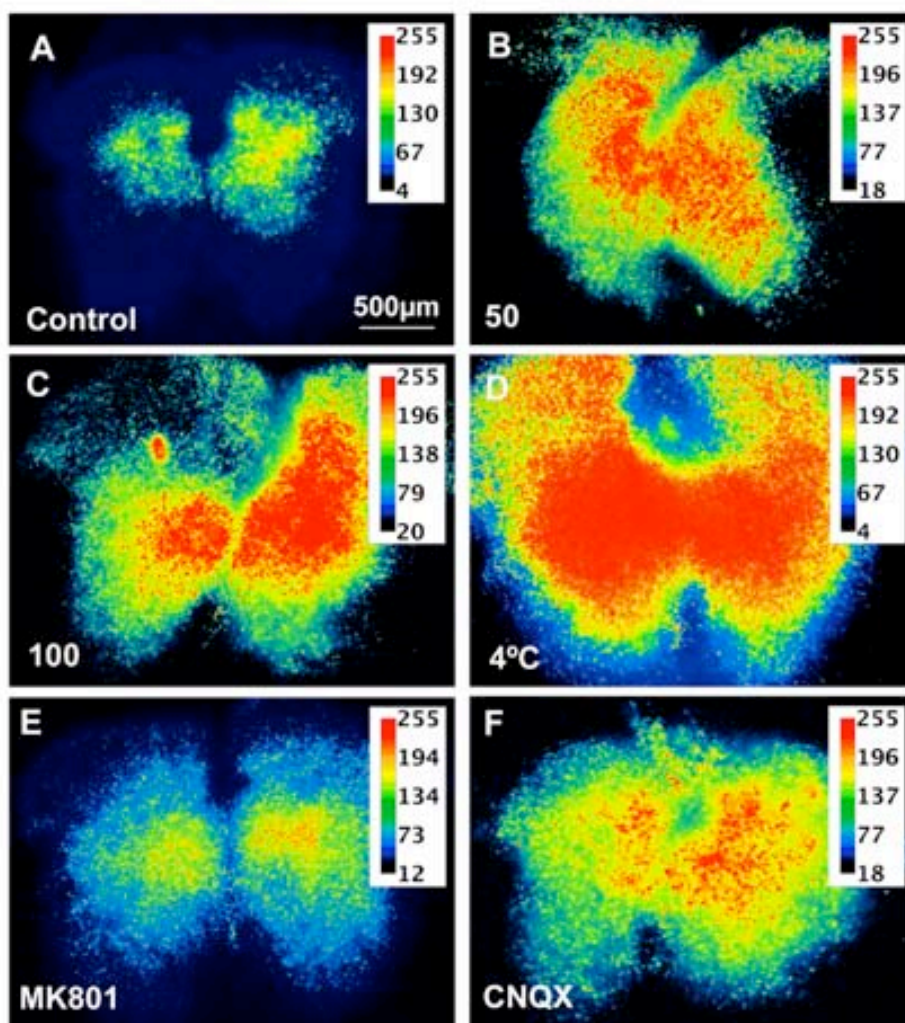


Figure 4

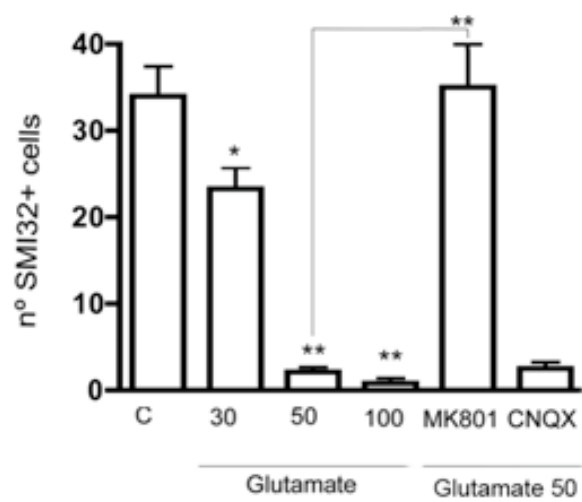
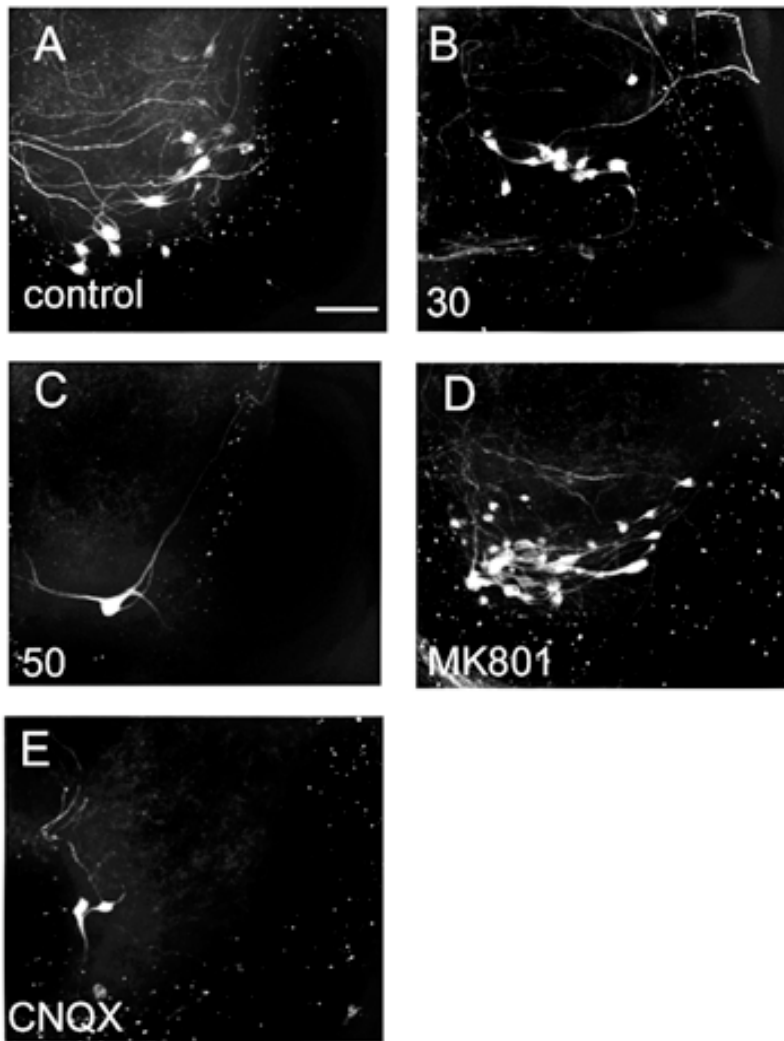
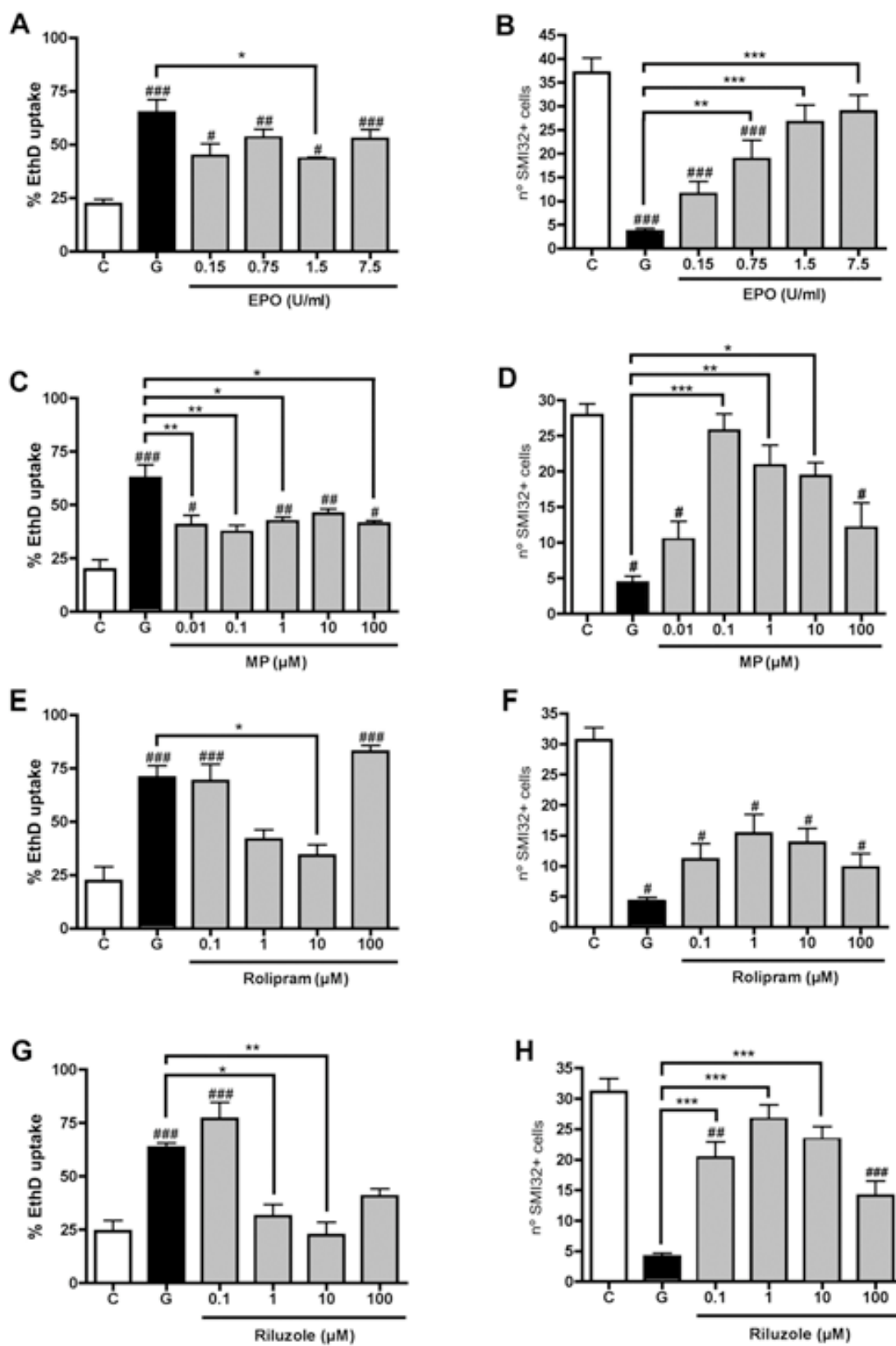


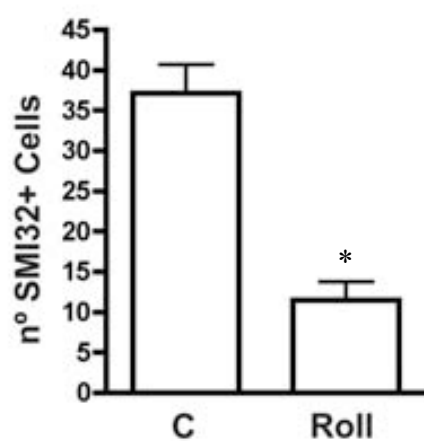
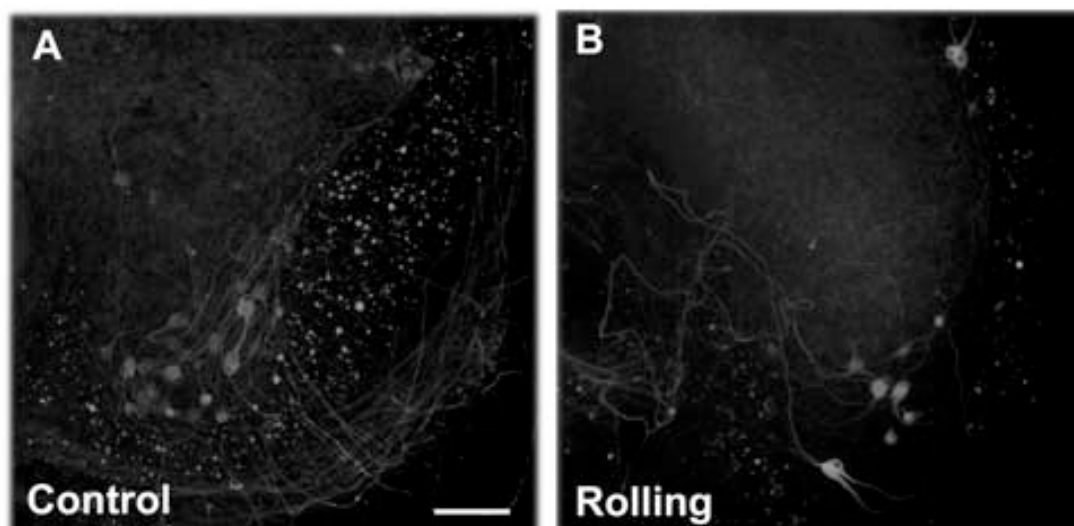
Figure 5



## ANEXO I

### **Modelo *in vitro* de lesión por contusión en organotípicos de médula espinal de rata**

Con el fin de reproducir *in vitro* los efectos de una lesión traumática medular a nivel tisular y molecular se ideó un modelo de lesión mecánica sobre los explantes que consistía en hacer rodar un cilindro sobre el tejido en cultivo (ver apartado materiales y métodos, pg 42). Este tipo de lesión fue descrita por Adamchik y colaboradores (2000) como un modelo de lesión primaria en explantes de hipocampo. Los explantes de médula espinal sometidos a la lesión traumática mostraron una disminución significativa en el número de motoneuronas SMI32 positivas (Fig. 1) después de dos días de haberse producido la lesión.



**Figura 1.** (Superior) Microfotografía de fluorescencia del asta ventral de los explantes de médula espinal mostrando las motoneuronas SMI32 positivas, en explantes cultivados de médula espinal no lesionados (A) y después de la lesión mecánica producida al rodar un cilindro de acero inoxidable (B). Escala= 100  $\mu$ m. (Inferior) Histograma mostrando las diferencias en el número de células SMI32 positivas (promedio  $\pm$  SEM) de los explantes de médula espinal control (C) o sometidos a lesión traumática (Roll) (n=22-27), \*P<0,001.

## ANEXO II

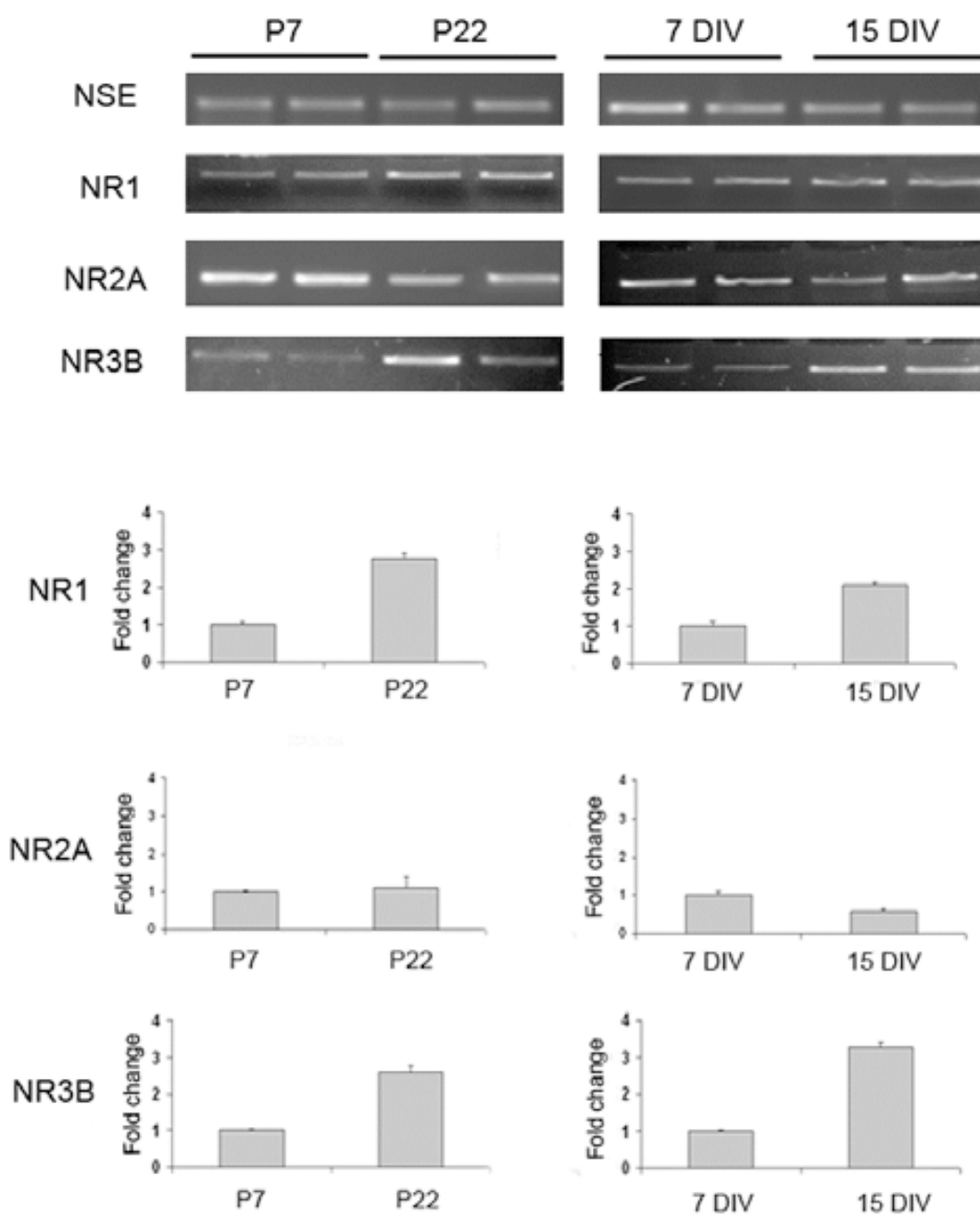
### **Cambios en el receptor NMDA durante la maduración *in vitro* de los cultivos organotípicos de médula espinal**

Los cultivos organotípicos madurados *in vitro* hasta 7 y 15 días fueron recogidos y procesados para extracción del ARN y su posterior uso en una PCR semi-cuantitativa. Esta PCR se realizó con el fin de observar si se producían en los explantes los cambios postnatales en las subunidades NR1, NR2A y NR3B del receptor NMDA que se producen durante el desarrollo postnatal (Fukaya et al., 2005; Nishi et al., 2001). La expresión génica de estos cultivos se comparó con la encontrada en los segmentos medulares torácicos de ratas postnatales de P7 y P22.

El receptor NMDA está compuesto por una subunidad obligatoria, la NR1, y por una de las cuatro subunidades reguladoras NR2A-D (Mori et al., 1994). Las subunidades NR3A-B también pueden encontrarse en lugar de las subunidades NR2 actuando como dominantes negativos del receptor (Andersson et al., 2001; Ciabarra et al., 1995; Matsuda et al., 2002; Nishi et al., 2001; Sucher et al., 1995). Durante el periodo embrionario y el periodo postnatal temprano, las motoneuronas expresan la subunidad NR2A, cuya expresión gradualmente decrece hasta el final de la segunda semana postnatal en rata, coincidiendo con el inicio de la expresión de la subunidad NR3B (Fukaya et al., 2005). Como nuestro interés era establecer un modelo *in vitro* de muerte de MNs por glutamato y habiendo observado que nuestro modelo excitotóxico era mediado mayoritariamente por la acción del receptor NMDA, analizamos si las condiciones de cultivo de los explantes permitían la maduración de los receptores NMDA de glutamato.

Como se esperaba, la expresión *in vivo* de los genes que codifican a las subunidades NR1 y NR3B se encontró regulada al alza, mientras que NR2A se observó ligeramente regulada a la baja en las medulas espinales de ratas P22 con respecto a las de los animales P7 (Fig. 2). Cambios similares fueron observados *in vitro*, NR1 y NR3B mostraron un incremento claro en los explantes de 15 días de cultivo *in vitro* (DIV) al compararlos con los de 7 DIV. Estos resultados indican que las MNs cultivadas organotípicamente son capaces de continuar su proceso de maduración natural del receptor NMDA.





**Figura 2.** Fotografía representativa de los fragmentos amplificados por PCR para el análisis semicuantitativo de los transcritos de la enolasa específica neuronal (NSE), NR1, NR2A y NR3B de segmentos medulares de ratas postnatales de 7 y 22 días y explantes de médula espinal cultivados durante 7 y 15 días *in vitro* (arriba). Histograma de barras mostrando los cambios relativos de expresión de cada subunidad NR con respecto a NSE en las diferentes muestras (abajo).

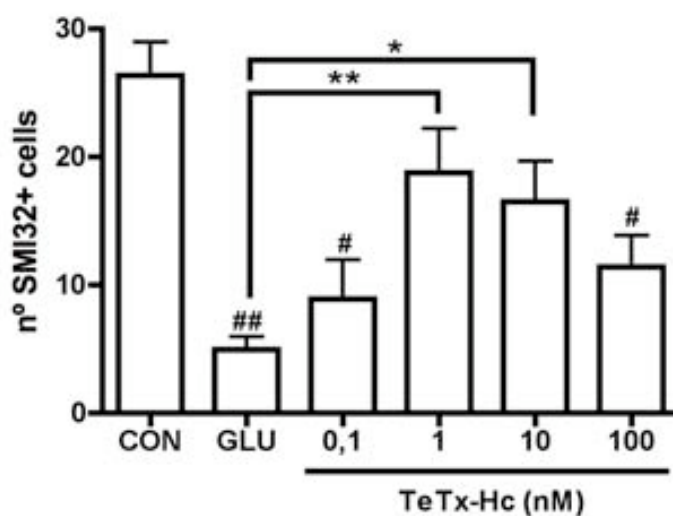
## ANEXO III

### **Efecto de la aplicación del fragmento c terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (TeTx-Hc) en un modelo *in vitro* de lesión excitotóxica por glutamato basado en cultivos organotípicos de médula espinal de rata**

En la exploración de fármacos neuroprotectores contra lesiones excitotóxicas se incluyó la aplicación de la región c-terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (TeTx-Hc) a los explantes de médula espinal lesionados con glutamato. La toxina tetánica es un análogo cercano a la familia de las neurotoxinas botulínicas y es producida por la bacteria gram positiva *Clostridium tetani*. La toxina, de 150 kDa, es seccionada por proteasas endógenas, dando origen a una cadena liviana (L) de 50 kDa, responsable de la toxicidad, y otra pesada (H), de 100 kDa. Es ésta cadena pesada, al ser seccionada por papaina, la que da origen a dos segmentos, uno en el extremo c-terminal, el TeTx-Hc, y otro en el n-terminal, la TeTx-Hn, cada uno de 50 kDa. El fragmento TeTx-Hc es el responsable de la unión a membranas celulares e internación de la toxina, mientras que el fragmento TeTx-Hn es el encargado de transportar a la cadena liviana a través de la membrana vesicular hacia el citosol (Lalli, 2003a).

Los explantes de médula espinal lesionados con glutamato fueron trasladados a pocillos con medio que contenía diferentes dosis de TeTx-Hc (desde 0,1 a 100 nM) e incubados en ellos durante dos días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda.

Los explantes tratados con TeTx-Hc mostraron, en general, un aumento en el número de neuronas SMI32 positivas (SMI32+) que sobrevivieron a la lesión (Fig. 3). Los tratamientos con 1 y 10 nM de TeTx-Hc fueron capaces de rescatar el 63-71% de las motoneuronas de una muerte por excitotoxicidad ( $p < 0,001$ ) y la máxima protección de motoneuronas ( $18,75 \pm 3.5$ ) se obtuvo con el tratamiento de TeTx-Hc 1 nM (Fig. 3).



**Figura 3.** Efecto de la aplicación de diferentes dosis de TeTx-Hc en la sobrevivencia de motoneuronas. Histograma mostrando el efecto de dosis crecientes de TeTx-Hc en el número de motoneuronas (Células SMI32+) sobrevivientes en los cultivos organotípicos de médula espinal no lesionados (CON) o lesionados con glutamato (GLU), o lesionados con glutamato y tratados con 0,1, 1, 10 y 100 nM de TeTx-Hc. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . #  $p < 0,01$ ; ##  $p < 0,001$  contra el control no lesionado (CON).

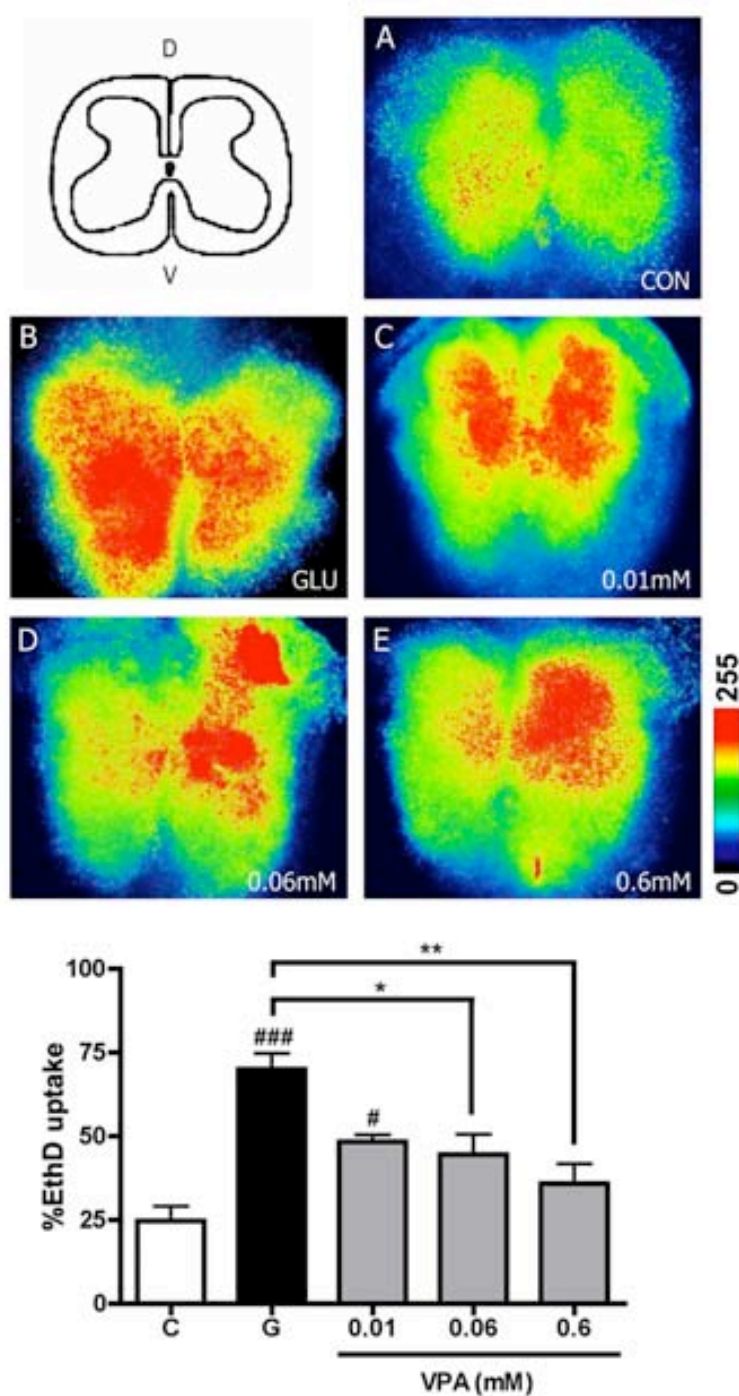
## ANEXO IV

### **Ensayo del valproato como agente neuroprotector en explantes de médula espinal sometidos a una lesión excitotóxica**

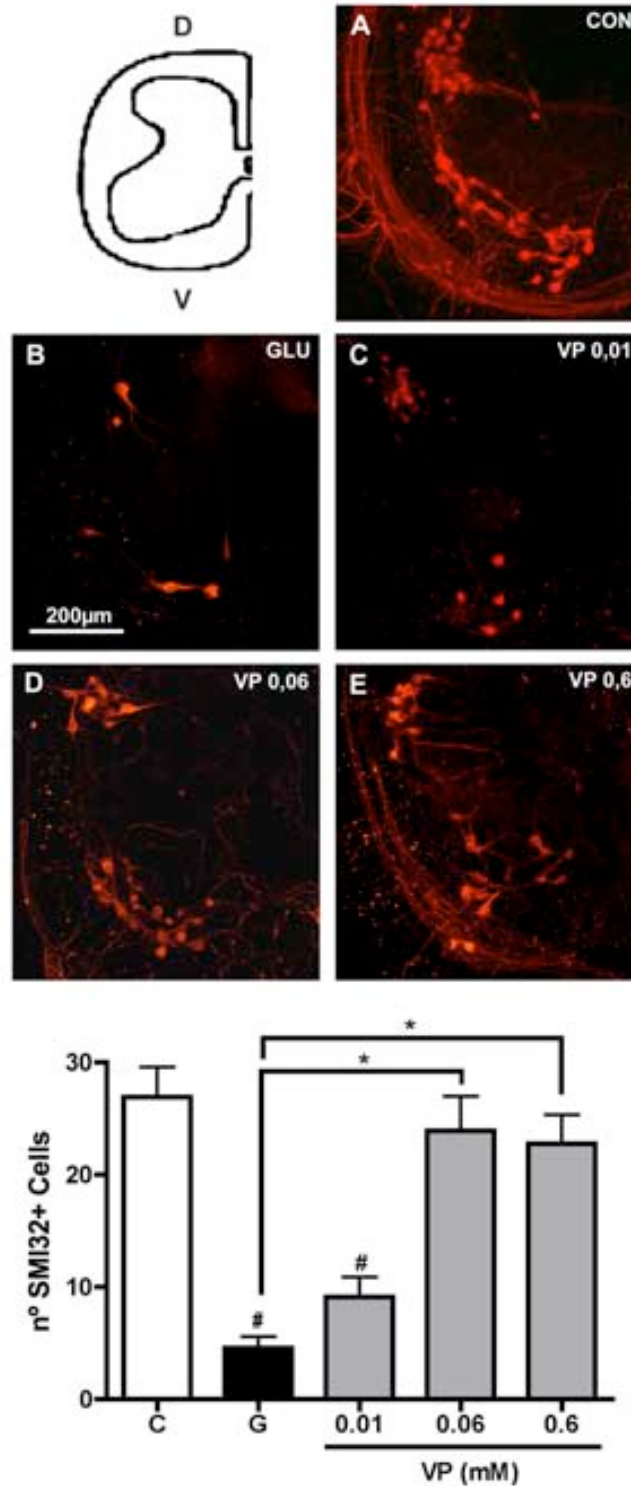
Utilizando los organotípicos de médula espinal lesionados con glutamato, realizamos un ensayo para determinar el potencial neuroprotector de valproato (VP) en contra de una lesión excitotóxica de la médula espinal. El fármaco fue adicionado al cultivo después de una exposición a glutamato 50  $\mu$ M durante 30 min; la medida densitométrica de la captación de EthD y el conteo del número de MNs sobrevivientes fue realizado 24 y 48 horas después, respectivamente.

Los explantes tratados después de la lesión con diferentes concentraciones de VP (0,01; 0,06; 0,6 mM) mostraron una reducción en la captación de EthD dependiente de la dosis, siendo significativa a 0,06 y 0,6 mM (captación de EthD  $44,5 \pm 6,1\%$ ,  $p < 0,05$  y  $35,8 \pm 5,9\%$ ,  $p < 0,01$ ) (Fig. 4), estos datos indican que valproato ejerce una protección máxima del 85,3% del tejido total.

En cuanto a las MNs, el tratamiento con VP a 0,06 y 0,6 mM protegió entre el 84,6 – 88,8% de las MNs de la excitotoxicidad por glutamato. Esta neuroprotección fue significativa ( $p < 0,001$ ) y el número de MNs obtenido no difería del registrado en los controles no lesionados (Fig. 5).



**Figura 4.** Microfotografías fluorescentes representativas mostrando la captación de EthD con ayuda de una máscara de intensidad, en explantes no tratados (A), o expuestos a glutamato 50  $\mu$ M (B), o expuestos a glutamato más VP 0.01 mM (C), 0.06 mM (D) o 0.6 mM. Abajo, histograma representando el porcentaje de captación de EthD por los diferentes tratamientos y el control (C) (n = 18 – 12). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 vs. lesionados (G); # p < 0,05; ### p < 0,001 vs. control (C).



**Figura 5.** Microfotografías fluorescentes de MNs ventrales, de gran tamaño y positivas para SMI32 que sobreviven en explantes de médula espinal no lesionados, ni tratados (A), lesionados con glutamato 50 μM (B), lesionados y tratados con VP 0,01 mM (C), 0,06 mM (D) y 0,6 mM (E). Abajo, histograma mostrando el número medio ± SEM de MNs positivas para SMI32 sobrevivientes en los diferentes tratamientos (n = 18 – 12). \*p < 0,001 vs. lesionado (G); # p < 0,001 vs. control (C).

# II

**Análisis del efecto neuroprotector del FK506**





Esta segunda sección de los resultados, al igual que la tercera, trata del uso del modelo de lesión para el ensayo de fármacos y como medio de ayuda para monitorizar los efectos del fármaco neuroprotector sobre los diferentes tipos celulares, al igual que sirve para adentrarse en parte de los mecanismos utilizados por éste al ejercer la neuroprotección.

Muchos estudios han demostrado que el tratamiento con FK506 incrementa la regeneración axonal y previene el daño axonal causado por neuropatías tóxicas (Gold et al., 2004; Udina et al., 2004). También se ha reportado que mejora la recuperación funcional, la protección neuronal y la regeneración axonal en modelos animales de SCI (López-Vales et al., 2005; 2006), es por esto que decidimos probar si la plicación de FK506 protegía a la médula espinal de una lesión excitotóxica, además de su posible mecanismo de acción debido a que los mecanismos que participan en esta neuroprotección permanecen poco claros. Escogimos evaluar la modulación de Hsp70 debido a que ha sido sugerido que el efecto neuroprotector de FK506 se debe en mayor parte a su interacción con FKBP52 y la subsecuente activación de esta chaperona antiapoptótica (Gold et al., 2004; Gold y Zhong, 2004).

El trabajo aquí expuesto trata únicamente del FK506 y su efecto en el modelo organotípico de lesión excitotóxica por glutamato, haciendo hincapié en los cambios que está ejerciendo en la expresión de la chaperona Hsp70 en la microglía.

El trabajo aquí comprendido es:

**Artículo 2.** Analysis of FK506-mediated protection in an organotypic model of spinal cord damage: Heat shock protein 70 levels are modulated in microglial cells.

(Publicado en *Neuroscience* 2008; 155: 104-13)



## ANALYSIS OF FK506-MEDIATED PROTECTION IN AN ORGANOTYPIC MODEL OF SPINAL CORD DAMAGE: HEAT SHOCK PROTEIN 70 LEVELS ARE MODULATED IN MICROGLIAL CELLS

M.-S. GUZMÁN-LENIS, C. VALLEJO, X. NAVARRO AND C. CASAS\*

Group of Neuroplasticity and Regeneration, Institute of Neurosciences and Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

**Abstract**—Functional loss after spinal cord injuries is originated by primary and secondary injury phases whose underlying mechanisms include massive release of excitatory amino acids to cytotoxic levels that contribute to neural death. Attenuation of this excitotoxicity is a key point for improving the functional outcome after injury. One of the drugs with potential neuroprotective actions is FK506, a molecule widely used as an immunosuppressant. FK506 may exert neuroprotection via inhibition of calcineurin by binding the FKBP12, or by binding other immunophilins such as FKBP52, leading to modulation of heat shock proteins (Hsp) 90 and 70. In the present study, we used an *in vitro* model of organotypic culture of rat spinal cord slices to assess whether FK506 is able to protect them against glutamate excitotoxicity. The results showed that FK506 promoted a significant protective effect on the spinal cord tissue at concentrations of 50 and 100 nM. Hsp70 induction was restricted to microglial cells in spinal cord slices treated with either glutamate or FK506. In contrast, the combination of both agents led to a transient reduction in Hsp70 levels in parallel to a marked reduction in IL-1 $\beta$  precursor production by glial cells. The use of geldanamycin, which promotes persistent induction of Hsp70 in these cells as well as in motoneurons, did not produce tissue neuroprotection. These observations suggest that FK506 might protect spinal cord tissue by targeting on microglial cells and that transient downregulation of Hsp70 on these cells after excitotoxicity is a relevant mechanism of action of FK506. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** FK506, spinal cord injury, organotypic culture, motoneuron, microglia, neuroprotection.

Spinal cord injuries (SCI) disrupt ascending and descending spinal pathways resulting in a devastating loss of sensory and motor functions, generally leading to long-lasting disability of affected patients. The initial impact causes immediate mechanical damage of the spinal cord resulting in massive cell death. A cascade of pathological events, known as secondary injury, develops hours to days after

the lesion, resulting in further exacerbation of tissue loss and functional deficits (Tator and Fehlings, 1991; Lu et al., 2000). During this period secondary changes take place distant from the initial injury site and may severely compromise the ability of spared systems that contribute to recovery. For example, atrophy or dysfunction of motor neurons below the injury can extend over periods of weeks or months after SCI (Chang, 1998; Garcia-Allias et al., 2006). Secondary injury changes include a rise of extracellular excitatory amino acid and free radicals concentrations to cytotoxic levels within minutes following trauma (Liu et al., 1991a, 1999; Farooque et al., 1996; Xu et al., 1998; McAdoo et al., 1999; Panter et al., 1990; Park et al., 2004), contributing to neural cell death (Choi, 1988; Lipton and Rosenberg, 1994). Prevention of excitotoxic-mediated cell death has thus been considered critical for improving the functional outcome after SCI. One of the drugs with potential neuroprotective actions for the treatment of SCI is FK506 or tacrolimus, a molecule widely used as an immunosuppressant to prevent rejection in organ transplantation. Several experimental studies have demonstrated that treatment with FK506 increases axonal regeneration after peripheral nerve injuries (Gold et al., 1995; Steiner et al., 1997; Udina et al., 2002, 2004), and prevents axonal damage in toxic neuropathies (Gold et al., 2004b). More recently, it has been shown that FK506 enhances functional recovery, neural protection and axonal sprouting in animal models of SCI (López-Vales et al., 2005, 2006; Madsen et al., 1998; Bavelle et al., 1999) suggesting a novel application for this drug. The mechanisms underlying this neuroprotective action remain unclear, so their elucidation may be useful for the design of selective drugs that mimic the protective and regenerative effects of FK506 but obviate immunosuppression and related side effects (Gold and Villafranca, 2003). The immunosuppressive action of FK506 involves its binding to the 12-kDa immunophilin FK506-binding protein (FKBP12) and consequent inhibition of the calcium-dependent phosphatase calcineurin (Liu et al., 1991b). However, FK506 may exert other actions by binding to different immunophilins, such as FKBP52, leading to modulation of heat shock protein (Hsp) 90 activity (McLaughlin et al., 2002; Davies and Sanchez, 2005) and consequent downstream up-regulation of Hsp70 (Klettner and Herdgen, 2003; Gold et al., 2004b). The aim of the present work was to assess whether application of FK506 is able to protect the spinal cord from an excitotoxic insult, and further investigate its possible mechanisms of action. For this purpose, we have used an *in vitro* model of excitotoxic lesion based on organotypic culture of spinal cord slices.

\*Correspondence to: C. Casas, Unitat de Fisiologia Mèdica, Edif. M, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain. Tel: +34-935811348; fax: +34-935812986.

E-mail address: cely.casas@uab.cat (C. Casas).

**Abbreviations:** EthD, ethidium homodimer-1; FKBP12, 12-kDa immunophilin FK506-binding protein; Hsp, heat shock protein; LPS, lipopolysaccharide; NO, nitric oxide; P, postnatal day; PBS, phosphate-buffered saline; SCI, spinal cord injury; TUJ,  $\beta$ III-tubulin.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Organotypic spinal cord and glial cell cultures

Organotypic slice cultures were prepared from Sprague–Dawley rats of postnatal day 7 (P7), using a modification of previously described methods (Stoppini et al., 1991; Rothstein et al., 1993). Briefly, pups were killed by over-exposure to CO<sub>2</sub> and decapitated, and the thoracic segment of their spinal cord was removed and placed in ice-cold high glucose (6 mg/ml) Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Under sterile conditions, meninges and roots were removed and the spinal cord was sectioned into 350 μm slices with a McIlwain Tissue Chopper (Gomshall, Surrey, UK). Up to five sections were carefully transferred onto Millicell-CM (Millipore, Bedford, MA, USA) culture plate inserts and placed into a six-well plate (Iwaki, Asahi Techno Glass, Chiba, Japan) containing 1.5 ml of Neurobasal medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) with 1× B27 (Gibco), 2 mM glutamine, 6 mg/ml glucose and antibiotics (100 U/ml penicillin and 10 μg/ml streptomycin), and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The following day, the medium was changed to remove antibiotics and incubated for the next 6 days to stabilize the culture. The medium was changed twice per week until 15 days *in vitro* (DIV). All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of our institution, and followed the European Communities Council Directive 86/609/EEC. We have exercised extreme care to minimize pain. All surgical procedures were carried out under deep general anesthesia. We have proceeded according to the requirements of the procedures themselves, always validated and approved by the local veterinary and animal welfare authorities. We have used the minimum number of animals required to carry out the experiments.

Astrocytes/microglia mixed primary cultures were prepared as previously described (Aguillo et al., 1990). Briefly, the cerebellum from P7 rats was dissociated by successive passages through nylon cloths (211 μm-Ø, 135 μm-Ø mesh) and cells were plated (1.2×10<sup>6</sup> cells/well) in Dubecco's modified Eagle's medium (Sigma) with 10% fetal-calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin and 10 μg/ml streptomycin, and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. After 15 days in culture cells were harvested after the addition of 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS, Sigma) for 20 h to promote glial reactivity.

### Excitotoxicity

Two-week-old spinal cord slices cultured in serum-free medium were placed in modified Locke's buffer (137 mM NaCl; 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 5.6 mM D-glucose; 0.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.01 mM glycine; 10 mM Hepes) with 50 μM glutamate, and incubated for 30 min. We have previously found that this concentration of glutamate was able to induce around 50% cell death in the spinal cord slices 2 days after the insult compared with those submitted to long-term cold stress (4 °C for 24 h) (Guzmán-Lenis and Casas unpublished observations). After washing out glutamate traces with medium, the inserts were transferred to warm-fresh medium with or without FK506 (Fujisawa Pharmaceuticals, Osaka, Japan) and incubated for 24 or 48 h. The concentrations of FK506 used (0.5–500 nM) were within the range of those previously described in *in vitro* assays (Dawson et al., 1993; Gold et al., 1999; Klettner and Herdegen, 2003; Muramoto et al., 2003). In other cultures, either cyclosporine A (Tocris, Bristol, UK) or geldanamycin (Sigma) was added instead of FK506. Sham-control samples were manipulated in the same way without the addition of glutamate.

### Viability test

We analyzed overall cell death in the slices by measuring the degree of ethidium homodimer-1 (EthD) uptake (Live/Death viability assay, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Cultured slices

were incubated with 1.5 μM EthD for 24 h after the excitotoxic insult or sham manipulations. Some slices were submitted to cold stress by leaving them at 4 °C for 24 h to induce a maximum injury on the slices. Following the period of incubation, images were taken with the aid of a digital camera (Olympus C-5050) attached to a fluorescence microscope (Olympus BX-70). Analyses were done with the ImageJ software (National Institutes of Health, USA) by adjusting the threshold above the background and fixing the upper level at 256. The integrated density was measured and used to calculate cell death expressed as percentage of EthD uptake with the formula: % EthD uptake = (Dtreat/Dmax)×100, where Dtreat is the integrated density of the treated slice and Dmax is the integrated density of the slice incubated at 4 °C for 24 h, which closely represents maximal lesion (Krassioukov et al., 2002; Adamchik et al., 2000; Frantseva et al., 1999).

### Western blot

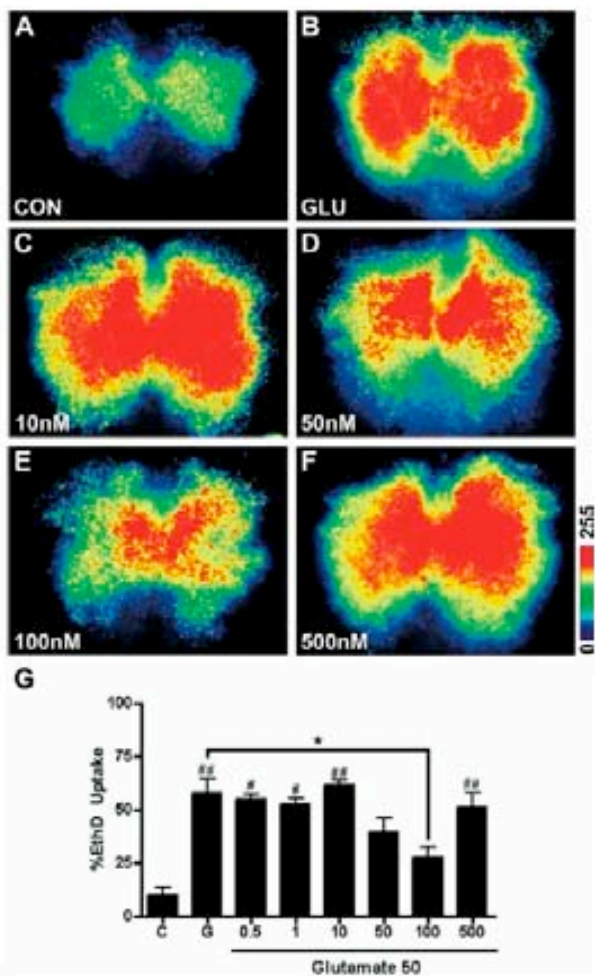
Cultured slices were homogenized in modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate (Sigma), 0.2% SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) containing protease inhibitor cocktail (10 μl/ml, Sigma). The homogenate was then centrifuged at 13,000×g and the supernatant obtained for protein concentration determination using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein (50 μg) were separated on 14% SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose membrane (Whatman, Dassel, Germany). The membranes were then incubated with 5% skimmed milk powder in TBS plus 0.05% tween-20 (TBST) for 30 min and incubated with primary antibodies anti-HSP70 (1:1000; Stressgen, Victoria, BC, Canada), anti-β-actin (1:1000; Sigma) or anti-IL-1β (1:100; Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA, USA) at 4 °C overnight. Horseradish peroxidase-coupled secondary antibody incubation was performed for 90 min at room temperature and after washing, blots were developed using SuperSignal West pico chemiluminescent substrate (Pierce). Signals were analyzed by band densitometry with the Gene Snap and Gene Tools software in a Gene Genome apparatus (Syngene, Cambridge, UK).

### Immunohistochemistry

Cultured slices were fixed with 4% paraformaldehyde, rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and, after blocking with 3% bovine serum and 0.3% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl at pH 7.4 (TBS), incubated with primary antibody overnight at 4 °C. Primary antibodies used were: anti-SMI32 (Stenberger Monoclonals, Baltimore, MD, USA), anti-GFAP (Chemicon, Temecula, CA, USA), anti-IB4 (Vector, Burlingame, CA, USA), anti-HSP70 and anti-FKBP52 (Stressgen), anti-βIII-tubulin (TUJ) (Covance, Berkeley, CA, USA), and anti-choline acetyltransferase (ChAT) (Chemicon). Incubation with secondary antibodies Cy3 anti-mouse and Cy2 anti-rabbit (Jackson, West Grove, PA, USA) was made overnight at 4 °C. After several washes, slices were dehydrated and mounted with DPX (Fluka, Buchs, Switzerland). The slices were observed with an Olympus BX-51 epifluorescence microscope equipped with a digital camera and processed with Photoshop. Confocal microscopic examinations were performed with a Leica TCS SP2 AOBs laser scanning confocal system (Leica, Heidelberg, Germany). Images were collected with a 1.4 numerical aperture oil-immersion 63× objective. Confocal images were obtained using two separate photomultiplier channels, either concurrently or in separate runs, and were separately projected and merged using a pseudocolor display showing green for Cy2, red for Cy3 and yellow for colocalization.

### Statistical analysis

All data presented are representative of at least four cultured slices of every experiment, repeated at least three times indepen-



**Fig. 1.** Digitized masked representative microphotographs of fluorescent rat spinal cord slices treated with EthD to quantify the degree of EthD uptake in either control slices (CON) (A), exposed to 50  $\mu$ M glutamate (GLU) (B) or to 50  $\mu$ M glutamate followed by addition of FK506 at 10 nM (C), 50 nM (D), 100 nM (E) or 500 nM (F) concentration. FK506 added at a range of 50–100 nM significantly reduced the percentage of EthD uptake by the spinal cord tissue ( $n=16-32$ ) (G). \*  $P<0.05$  and #  $P<0.01$ , ##  $P<0.001$  with respect to control slices.

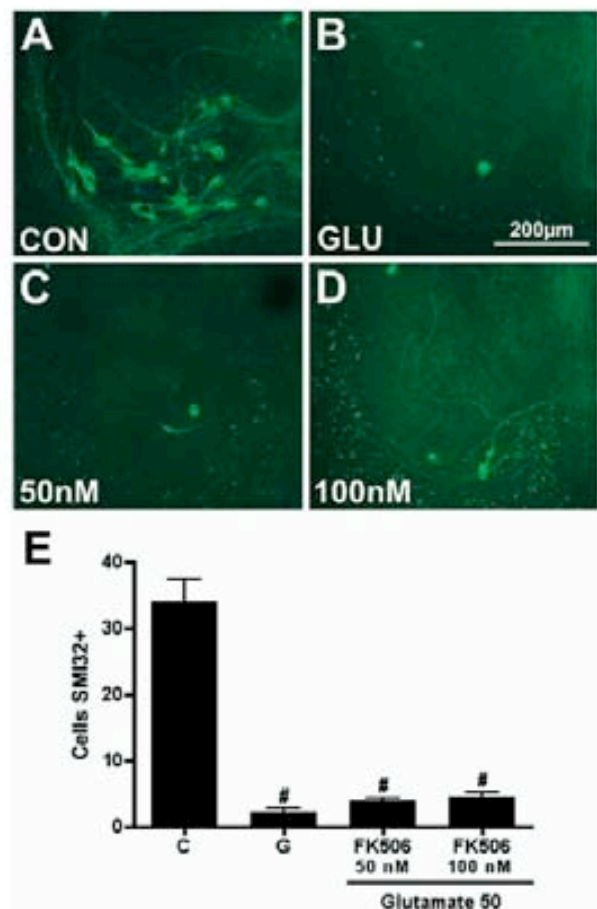
dently. Statistical analysis was carried out using analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post hoc test. Differences were considered to be significant if  $P<0.05$ .

**RESULTS**

**FK506 preserves damaged spinal cord tissue**

In order to assess whether FK506 was able to exert protection against excitotoxicity on the spinal cord tissue, we used an organotypic spinal cord culture that can be maintained for long periods in a serum-free medium (Guzmán-Lenis and Casas, unpublished observations). Excitotoxic damage on the slices was induced by exposing them to 30 min contact with 50  $\mu$ M glutamate, and cell viability was tested by the quantification of EthD uptake, which enters into damaged cells and enhances its fluorescence by coupling to the nucleic acids (Glazer et al., 1990; Moore et al., 1990). Glutamate-damaged

slices presented a fivefold increase in EthD pixel density per spinal cord area [Fig. 1]. Based on densitometric measurements of the fluorescence emitted, the gray matter was more susceptible to damage than the white matter of the slices. Cultures treated with FK506 showed a concentration-dependent reduction in cellular EthD uptake of 18% for 50 nM and 31% for 100 nM FK506, compared with cultures exposed to glutamate only ( $P<0.05$  for 100 nM) [Fig. 1]. FK506 at lower (0.5, 1 and 10 nM) or higher (500 nM) concentrations did not have a significant protective effect. Control cultures and non-lesioned cultures exposed to FK506 presented low percentages of EthD uptake. Because the gray matter was more sensitive to those treatments, we investigated the particular effect of FK506 on motoneuron survival by immunostaining slices with the SMI32 antibody that specifically recognizes motoneurons in the spinal cord (Tsang et al., 2000; Avossa et al., 2003). Glutamate excitotoxicity induced a severe and dose-dependent reduction in the number of SMI32-positive ventral horn neurons [Fig. 2]. Addition of FK506 induced mild mo-



**Fig. 2.** Microphotographs of ventral SMI32-positive motoneurons in control spinal cord slices (CON) (A), after exposure to 50  $\mu$ M glutamate (GLU) (B) or to 50  $\mu$ M glutamate followed by addition of 50 nM (C) or 100 nM FK506 (D). Bar histogram showing the average number  $\pm$  S.E.M. of SMI32-positive neuronal cells surviving in the slices in the different conditions ( $n=16-32$ ) (E). #  $P<0.001$  with respect to control slices.

toneuron survival ( $13 \pm 2\%$  at 100 nM) [Fig. 2E]. Treatment with FK506 alone for 24 or 48 h at concentrations up to 100 nM caused no changes in SMI32-positive neuronal numbers (data not shown).

**FK506 modulates glutamate-induced Hsp70 protein levels**

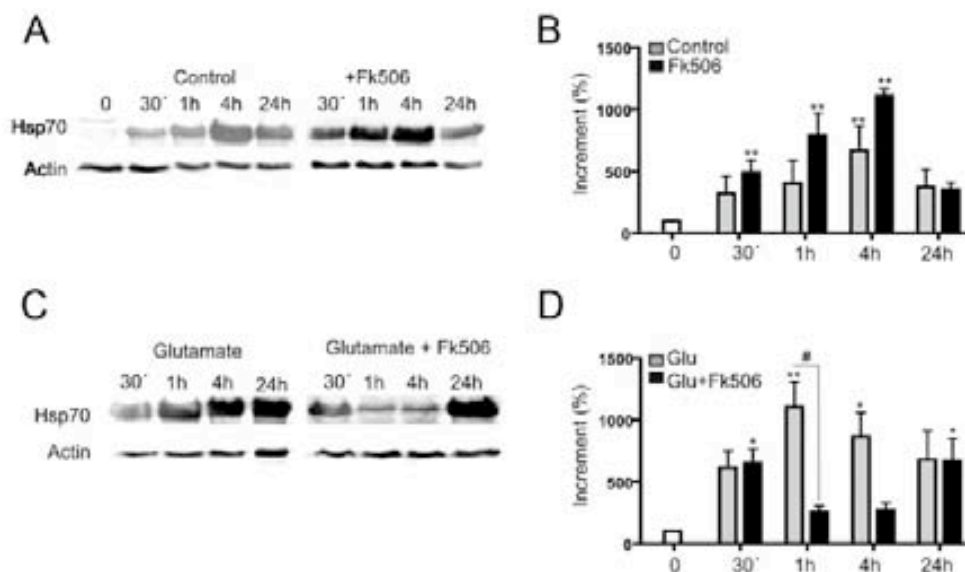
Since it has been suggested that FK506 neuroprotective effects might be mediated by Hsp70 induction (Klettner and Herdegen, 2003; Gold et al., 2004b), we next attempted to investigate the induction of this chaperone in the organotypic model by immunoblotting. In control slices, Hsp70 protein was barely detected, as expected since it is considered to be an inducible chaperone, but it was slightly induced in sham-control slices that were manipulated in the same way as injured slices although without the use of glutamate [Fig. 3A and B]. The addition of FK506 on sham-control slices promoted an early and significant induction of Hsp70 protein after 30 min and sustained for at least 4 h. Glutamate excitotoxicity caused a progressive and significant increase in Hsp70 protein levels with a maximum reached by 1 h post-insult [Fig. 3C and D]. The addition of FK506 to glutamate-injured slices produced a significant and transient reduction on Hsp70 protein levels during the first 4 h after glutamate treatment.

**FK506 targets Hsp70 levels in microglial cells**

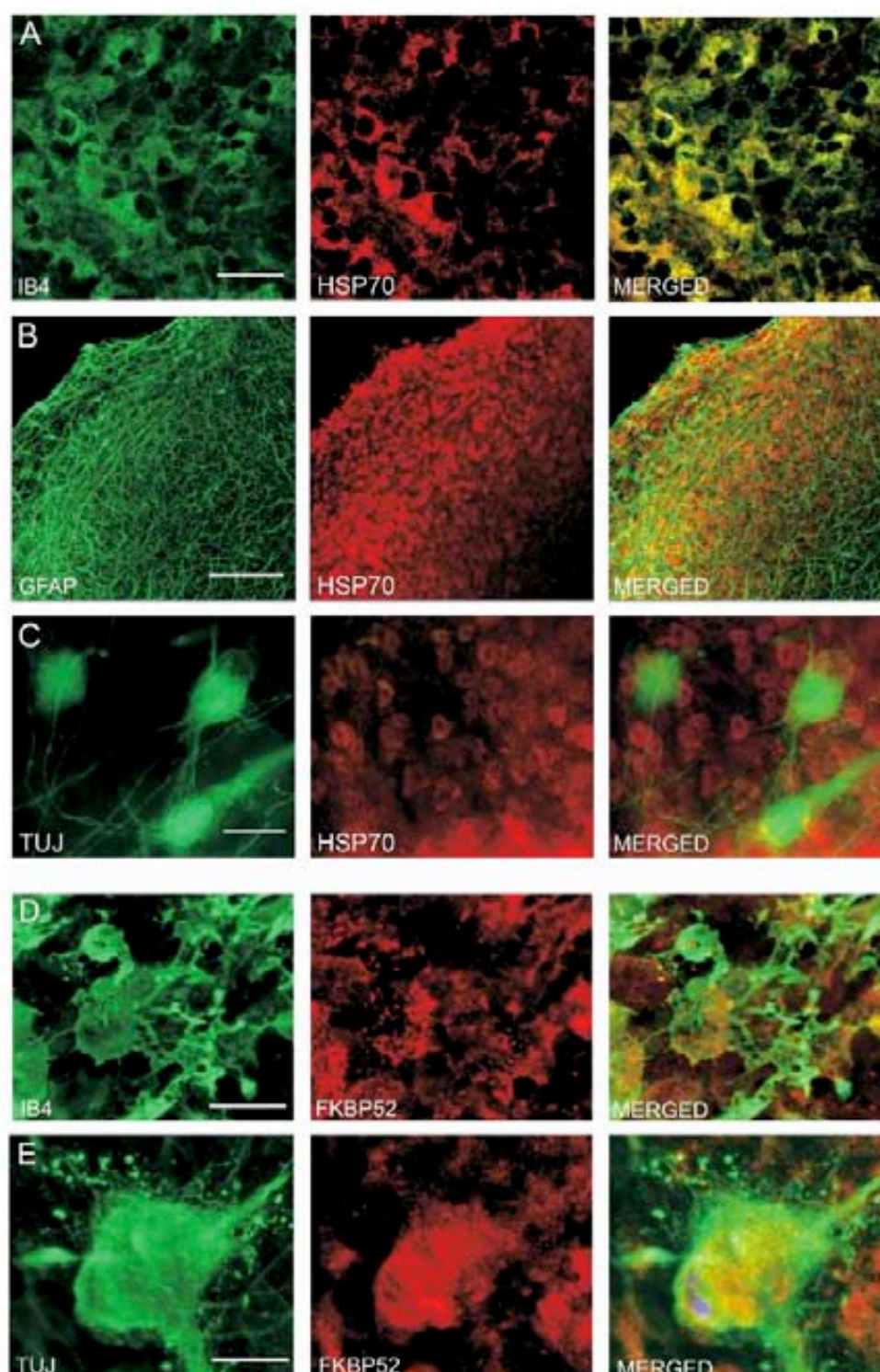
Because Hsp70 protein overexpression has been demonstrated to be neuroprotective (Lowenstein et al., 1991; Lai et al., 2005), we questioned which cells accumulated Hsp70 protein after glutamate insult and hence were susceptible to be targeted by the treatment with FK506. In agreement with the results obtained by Western blot analysis, Hsp70 protein was clearly labeled in glutamate-treated slices, less detected in glutamate plus FK506 treated slices by 4 h post-injury and not detected at all in control slices. Confocal co-localization analysis was performed on the glutamate-treated slices and showed that Hsp70 was mainly detected in microglial cells and not in motoneurons and astroglial cells [Fig. 4A–C]. We also verified that the immunophilin FKBP52 that binds FK506 to induce Hsp70 expression was expressed in both microglia and neuronal cells [Fig. 4D and E].

**Specificity of FK506 action**

In order to ascertain if the tissue neuroprotective effect of FK506 could be due to its ability to bind FKBP12 and hence act through calcineurin downstream pathways, we treated other injured slices with cyclosporine A, a specific inhibitor of calcineurin. In addition, we wondered whether the transient downregulation of Hsp70 observed in microglia in the damaged slices treated with FK506 was relevant for its neuroprotective effect. Thus, we used geldanamycin, a known Hsp90 inhibitor (Roe et al., 1999) and hence Hsp70 inducers, to treat damaged slices and maintain Hsp70 expression at high levels during the whole period. As shown in Fig. 5A and B, the percentages of EthD uptake in the damaged slices treated with either cyclosporine A or geldanamycin were similar to that of untreated damaged slices. Only FK506 was able to significantly reduce the EthD uptake. Cyclosporine A and FK506 treatment resulted in similar numbers of labeled surviving motoneurons, whereas a slight increase was found in damaged slices treated with geldanamycin although no statistical significance was reached [Fig. 5C]. Interestingly, when slices were pre-treated with FK506 before the onset of glutamate insult, the number of surviving motoneurons also increased but not significantly.



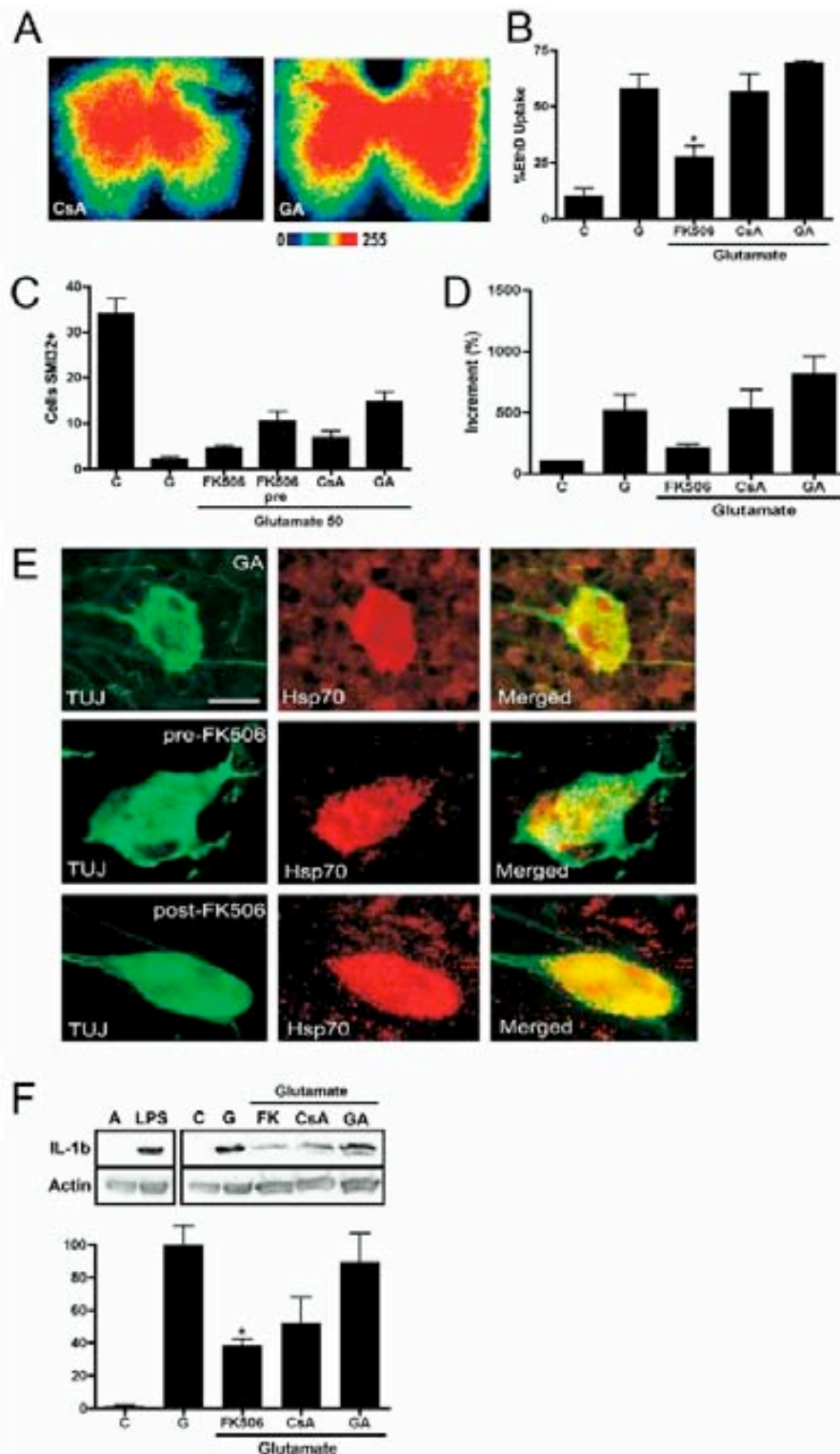
**Fig. 3.** Early FK506-mediated Hsp70 protein level induction assessed by Western blot occurs in sham slices (A, B). Hsp70 protein levels progressively increase after the excitotoxic insult, whereas treatment with 100 nm FK506 produced a transient decrease from 1h to 4 h postinjury (C, D). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  with respect to control slices at time 0; #  $P < 0.05$  for FK506-treated versus untreated glutamate damaged slices.



**Fig. 4.** Representative laser confocal images showing restricted co-localization of Hsp70 induction and IB4 immunoreactivity in microglial cells (A), but not in GFAP-positive astroglial cells (B) nor in TUJ-positive neurons on glutamate-treated spinal cord slices at 4 h post-injury. Representative images showing expression of FKBP52 in microglial (D) and neuronal (E) cells. Scale bar=20  $\mu\text{m}$  in A, C, D, E and 100  $\mu\text{m}$  in B.

As expected, the Hsp70 protein levels increased at 4 h post-injury in the damaged slices treated with geldanamycin but not with cyclosporine A [Fig. 5D]. Immunohistochemical labeling showed that Hsp70 was expressed in

motoneurons as well as in microglia in the slices treated with geldanamycin [Fig. 5E]. Hsp70 expression in motoneurons was also detected in FK506-treated damaged slices only if they were either pre-treated before glutamate



**Fig. 5.** Digitized masked representative microphotographs of EthD uptake in damaged spinal cord slices treated with cyclosporine A (CsA) or geldanamycin (GA) (A). Bar histogram showing the percentage of EthD uptake in control (C), glutamate-injured (G) slices and damaged slices treated with FK506, CsA (1 μM) or GA (10 nM) (B). Bar histogram showing the number of SMI32-positive neurons in the slices submitted to the different treatments postinjury or to FK506 pre-treatment (FK506 pre) before glutamate (C). Increase of Hsp70 protein level measured by Western blot analysis in the slices subjected to the different treatments with respect to control (D). Representative fluorescent images of TUJ immunolabeled motoneurons expressing Hsp70 in the damaged slices 48 h post-insult, treated with either GA following the insult, FK506 previously to the insult (pre-FK506) or FK506 during 7 days after the insult (post-FK506) (E). Scale bar = 20 μm. Immunoblots for IL-1β precursor (F). On the left, extracts from mixed glial cell cultures treated with PBS (A) or 1 μM LPS showing induction of IL-1β precursor after LPS treatment. In the spinal cord slices (on the right and bar histogram), the levels of IL-1β precursor are strongly induced by glutamate (G), in comparison with control slices (C), but significantly reduced by treatment with 100 nm FK506 during 24 h and not by CsA and GA.



or if they were maintained for a week post-injury with the treatment [Fig. 5E].

#### **FK506 and cyclosporine A reduce glutamate-induced cytokine overproduction in the spinal cord slices**

We wondered whether the effect on Hsp70 reduction mediated by FK506 on damaged slices that targets microglia was related to changes in production of cytokines, since these cells may contribute to excitotoxic damage by the overproduction of several cytokines, particularly IL-1 $\beta$  (Sasaki et al., 2004; Hayashi et al., 2006; Haller et al., 2005; Wilde et al., 2000; Liu et al., 1991a; Streit et al., 1999). Therefore, we analyzed the accumulation of IL-1 $\beta$  precursor in the cultured slices under different conditions by Western blot and used mixed glia cultures treated with LPS as positive control since LPS induces glial reactivity. As expected, in glutamate-treated slices there was an increase in the levels of IL-1 $\beta$  precursor by 24 h post-injury, which was significantly reduced when FK506 was used to treat injured slices [Fig. 5F]. We did not detect IL-1 $\beta$  precursor in control slices or in control slices treated only with FK506. Cyclosporine A treatment of the damaged slices produced a similar but less marked effect, whereas treatment with geldanamycin did not reduce IL-1 $\beta$  production [Fig. 5F].

### **DISCUSSION**

The purpose of this study was to investigate the protective effect of FK506 on glutamate-damaged spinal cord tissue using an organotypic-based model in order to shed light on the possible mechanisms by which FK506 promotes functional recovery after SCI. We used cultured spinal cord slices because they retain many organizational features of the host tissue, such as neuronal connectivity, relatively well-preserved cellular architecture and glial–neuronal interactions (Gahwiler et al., 1997; Gahwiler, 1981; Corse and Rothstein, 1995; Avossa et al., 2003). For these reasons, organotypic spinal cord slice cultures are increasingly used to study neuronal cell death in a variety of experimental models (Galante et al., 2000; Krassioukov et al., 2002; Lee et al., 2002; Rothstein et al., 1993; Corse and Rothstein, 1995). We found that treatment with FK506 onto lesioned spinal cord slices promoted a protective effect of the tissue, particularly in the gray matter, in a bell-shaped dose-response manner. This effect is in agreement with previous studies carried out on animal models of SCI in which treatment with FK506 significantly reduced the size of the cord cavity produced by the lesion (López-Vales et al., 2005). Furthermore, a bell-shaped dose-response of FK506 has been reported on the rate of axonal regeneration *in vivo* (Wang et al., 1997; Udina et al., 2002) and *in vitro* on neurite outgrowth studies (Chang et al., 1995; Gold et al., 1999) where higher concentrations (40–50  $\mu$ m) compromise glial cell viability as well (Zawadzka and Kaminska, 2003). Notwithstanding, in contrast with our findings, other *in vitro* studies have reported that FK506 at 500 nM has a neuroprotective effect against oxidative- (Klettner and Herdegen, 2003), and NMDA-mediated toxicity (Dawson et

al., 1993). However, the differences might be due to technical issues such as the use of serum in their cellular models and the differences in cell lines and type of injury used.

It was initially reported that FK506 protects neurons from glutamate toxicity by reducing nitric oxide (NO) –mediated toxicity through calcineurin inhibition (Dawson et al., 1993). However, *in vivo* experiments did not show a prominent reduction in NO formation in the ischemic brain of animals treated with FK506 (Sasaki et al., 2004). Furthermore, we have used cyclosporine A that specifically inhibits calcineurin and it did not promote tissue protection in our excitotoxic model. A current hypothesis is that most of the FK506-mediated neuroprotective effect in CNS and peripheral nervous system injury models may occur via FKBP52 binding and consecutive induction of the anti-apoptotic protein Hsp70 (Gold and Villafranca, 2003; Gold et al., 2004a). In this regard, Gold et al. (2004b) found that FK506 induced Hsp70 expression in lumbar motoneurons of animals with acrylamide-induced neuropathy by 15 days post-injury. We analyzed Hsp70 induction promoted by FK506 in our excitotoxic model, and we did not detect early Hsp70 expression in neurons in the damaged slices (by 4 h after injury) except if they were pre-treated before the glutamate insult. However, Hsp70 was detected in motoneurons later on, by 7 days post-injury after chronic administration of FK506, in agreement with the aforementioned findings by Gold et al. (2004b). Our observations are also in agreement with other studies showing that spinal motoneurons *in situ* failed to induce Hsp70 after heat shock (Manzerra and Brown, 1992; Brown and Rush, 1999) and spinal cord contusion (Mautes and Noble, 2000) in contrast to glial cells and other types of neurons, such as cerebellar, cortical and pyramidal neurons, which upregulate Hsp70 after heat shock (Lowenstein et al., 1991; Bechtold et al., 2000) and excitotoxic insult (Sato and Matsuki, 2002). Hence, Hsp70 induction seems to depend upon the cell type, the type of stimulus and the state of the cell. Indeed, motoneurons have a higher threshold to activate gene expression through heat shock factor (HSF), the major cellular stress sensor upstream Hsp70, than other cell types (Morimoto, 1998; Batulan et al., 2003), and, as from the present study, they did not respond in the same way under an excitotoxic stimulus than in the resting state.

An interesting and novel finding of our work is that microglial cells are the only ones that presented Hsp70 induction in response to glutamate or FK506 treatment alone. Excitotoxicity triggers a glial reactive response characterized by the release of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and IL-1 $\beta$  that are mainly produced by microglial cells (Christensen et al., 2006; Hayashi et al., 2006). The production of cytokines by microglial cells leads to concomitant up-regulation of Hsp70 (Fincato et al., 1991; Barrow and Dasu, 2005). Hsp70, as a chaperone, protects cells from proteotoxic stress by a variety of “holding and folding” pathways that prevent the formation of denatured proteins and the progression of lethal aggregation cascades in cells, and prevents cell death through both necrotic and apoptotic path-

ways (Georgopoulos and Welch, 1993). This opens the question of whether microglial cells require Hsp70 to protect themselves from excitotoxicity, as has been suggested (Jeon et al., 2004). In the case of FK506 treatment alone, its effect on Hsp70 induction was expected since FK506 binding to FKBP52 produces a downstream up-regulation of this chaperone (Klettner and Herdegen, 2003; Gold et al., 2004b). We found that FKBP52 is expressed in both motoneurons and microglial cells. In contrast, when glutamate and FK506 were used in combination, we found a fast and transient reduction in Hsp70 levels. This result may be explained by the particular behavior of microglial cells that respond differently to the same stimulus depending on whether another stimulus precedes or follows it, suggesting that microglial reactivity is determined by acquired phenotype rather than stereotypically (Hausler et al., 2002; Butovsky et al., 2005; Shaked et al., 2005; Schwartz et al., 2006).

The reduction of Hsp70 may have implications in neuroprotection due to the close relationship between cytokine production and Hsp70 induction in microglial cells. We found a downregulation of IL-1 $\beta$  precursor levels induced by FK506 treatment on the injured slices, which might participate in the transient reduction of Hsp70 levels. This reduction may occur through FK506 binding to FKBP12 and consequent inhibition of calcineurin, which blocks the NF-AT-regulating cytokine gene expression in glial cells and as a result causes a reduction of Hsp70 levels (Kaminska et al., 2004; Zawadzka and Kaminska, 2003; Zawadzka and Kaminska, 2005). However, when we used cyclosporine A to specifically inhibit calcineurin via FKBP12, there was a reduction in cytokine expression but not in Hsp70 levels. Thus, the mechanisms to explain the transient Hsp70 downregulation mediated by FK506 on microglial cells after excitotoxicity remain unclear, although it is relevant because Hsp70 persistent induction mediated by geldanamycin did not promote any tissue protection.

## CONCLUSION

In summary, FK506 has significant protective effects on the spinal cord tissue after acute excitotoxic damage although it exerts only modest pro-survival effects on motoneurons. The FK506 protection against excitotoxicity can be due in part to direct inhibition of microglial reactivity and the transient downregulation of Hsp70 on these cells. The modulation of microglial reactivity after injury may be a significant mechanism underlying the improved histological and functional outcomes found by FK506 treatment after *in vivo* SCI (López-Vales et al., 2005), in addition to the proregenerative actions of FK506 that also promote axonal regrowth (Bavetta et al., 1999; Madsen et al., 1998; Wang and Gold, 1999; López-Vales et al., 2006). Chronic administration of FK506 might be necessary to increase Hsp70 expression in motoneurons and serve to prevent further injury to them.

*Acknowledgments*—This research was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2006-08682) and the Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060201) of Spain, the Euro-

pean Commission (Marie-Curie Reintegration Grant, MERG-CT-2004-006381), and FEDER and CIBERNED funds. C.G. is recipient of a Juan de la Cierva fellowship. Fujisawa Pharmaceuticals Inc. (Osaka, Japan) generously provided FK506.

## REFERENCES

- Adamchik Y, Frantseva MV, Weisspapir M, Carlen PL, Perez Velazquez JL (2000) Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc* 5:153–158.
- Agullo L, Picatoste F, Garcia A (1990) Histamine stimulation of cyclic AMP accumulation in astrocyte-enriched and neuronal primary cultures from rat brain. *J Neurochem* 55:1592–1598.
- Avossa D, Rosato-Siri MD, Mazzarol F, Ballerini L (2003) Spinal circuits formation: a study of developmentally regulated markers in organotypic cultures of embryonic mouse spinal cord. *Neuroscience* 122:391–405.
- Barrow RE, Dasu MR (2005) Oxidative and heat stress gene changes in hypertrophic scar fibroblasts stimulated with interleukin-1beta. *J Surg Res* 126:59–65.
- Batulan Z, Shinder GA, Minotti S, He BP, Doroudchi MM, Naibantoglu J, Strong MJ, Durham HD (2003) High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate HSF1. *J Neurosci* 23:5789–5798.
- Bavetta S, Hamlyn PJ, Burnstock G, Lieberman AR, Anderson PN (1999) The effects of FK506 on dorsal column axons following spinal cord injury in adult rats: neuroprotection and local regeneration. *Exp Neurol* 158:382–393.
- Bechtold DA, Rush SJ, Brown IR (2000) Localization of the heat-shock protein Hsp70 to the synapse following hyperthermic stress in the brain. *J Neurochem* 74:641–646.
- Brown IR, Rush SJ (1999) Cellular localization of the heat shock transcription factors HSF1 and HSF2 in the rat brain during post-natal development and following hyperthermia. *Brain Res* 821:333–340.
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M (2005) Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci* 29:381–393.
- Chang CW (1998) Evident transsynaptic degeneration of motor neurons after spinal cord injury: a study of neuromuscular jitter by axonal microstimulation. *Am J Phys Med Rehabil* 77:118–121.
- Chang HY, Takei K, Sydor AM, Born T, Rusnak F, Jay DG (1995) Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin. *Nature* 376:686–690.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623–634.
- Christensen RN, Ha BK, Sun F, Bresnahan JC, Beattie MS (2006) Kainate induces rapid redistribution of the actin cytoskeleton in amoeboid microglia. *J Neurosci Res* 84:170–181.
- Corse AM, Rothstein JD (1995) Organotypic spinal cord cultures and a model of chronic glutamate-mediated motor neuron degeneration. In: *Central nervous system trauma research techniques* (Ohnishi ST, Ohnishi TE, eds), pp 341–351. New York: CRC Press.
- Davies TH, Sanchez EE (2005) Fkbp52. *Int J Biochem Cell Biol* 37:42–47.
- Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH (1993) Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9808–9812.
- Farooque M, Hillered L, Holtz A, Olsson Y (1996) Changes of extracellular levels of amino acids after graded compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using microdialysis. *J Neurotrauma* 13:537–548.

- Fincato G, Polentarutti N, Sica A, Mantovani A, Colotta F (1991) Expression of a heat-inducible gene of the HSP70 family in human myelomonocytic cells: regulation by bacterial products and cytokines. *Blood* 77:579–586.
- Frantseva MV, Carlen PL, El-Beheiry H (1999) A submersion method to induce hypoxic damage in organotypic hippocampal cultures. *J Neurosci Methods* 89:25–31.
- Gahwiler BH (1981) Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 4:329–342.
- Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 20:471–477.
- Galante M, Nistri A, Ballerini L (2000) Opposite changes in synaptic activity of organotypic rat spinal cord cultures after chronic block of AMPA/kainate or glycine and GABAA receptors. *J Physiol* 523 (Pt 3):639–651.
- García-Allas G, Valero-Cabré A, López-Vales R, Forés J, Verdú E, Navarro X (2006) Differential motor and electrophysiological outcome in rats with mid-thoracic or high lumbar incomplete spinal cord injuries. *Brain Res* 1108:195–204.
- Georgopoulos C, Welch WJ (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 9:601–634.
- Glazer AN, Peck K, Mathies RA (1990) A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: application to picogram fluorescence detection of DNA in agarose gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3851–3855.
- Gold BG, Densmore V, Shou W, Matzuk MM, Gordon HS (1999) Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1202–1210.
- Gold BG, Katoh K, Storm-Dickerson T (1995) The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *J Neurosci* 15:7509–7516.
- Gold BG, Udina E, Bourdette D, Navarro X (2004a) Neuroregenerative and neuroprotective actions of neuroimmunophilin compounds in traumatic and inflammatory neuropathies. *Neurol Res* 26:371–380.
- Gold BG, Voda J, Yu X, Gordon H (2004b) The immunosuppressant FK506 elicits a neuronal heat shock response and protects against acrylamide neuropathy. *Exp Neurol* 187:160–170.
- Gold BG, Villafranca JE (2003) Neuroimmunophilin ligands: the development of novel neuroregenerative/neuroprotective compounds. *Curr Top Med Chem* 3:1368–1375.
- Hailer NP, Vogt C, Korf HW, Dehghani F (2005) Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 21:2347–2360.
- Hausler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002) Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci* 16:2113–2122.
- Hayashi Y, Ishibashi H, Hashimoto K, Nakanishi H (2006) Potentiation of the NMDA receptor-mediated responses through the activation of the glycine site by microglia secreting soluble factors. *Glia* 53:660–668.
- Jeon GS, Park SW, Kim DW, Seo JH, Cho J, Lim SY, Kim SD, Cho SS (2004) Glial expression of the 90-kDa heat shock protein (HSP90) and the 94-kDa glucose-regulated protein (GRP94) following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Glia* 48:250–258.
- Kaminska B, Gaweda-Walerych K, Zawadzka M (2004) Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants: facts and hypotheses. *J Cell Mol Med* 8:45–58.
- Klettner A, Herdegen T (2003) The immunophilin-ligands FK506 and V-10,367 mediate neuroprotection by the heat shock response. *Br J Pharmacol* 138:1004–1012.
- Krassioukov AV, Ackery A, Schwartz G, Adamchik Y, Liu Y, Fehlings MG (2002) An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. *Brain Res Brain Res Protoc* 10:60–68.
- Lai Y, Du L, Dunsmore KE, Jenkins LW, Wong HR, Clark RS (2005) Selectively increasing inducible heat shock protein 70 via TAT-protein transduction protects neurons from nitrosative stress and excitotoxicity. *J Neurochem* 94:360–366.
- Lee YS, Baratta J, Yu J, Lin VW, Robertson RT (2002) AFGF promotes axonal growth in rat spinal cord organotypic slice co-cultures. *J Neurotrauma* 19:357–367.
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330:613–622.
- Liu D, Thangnipon W, McAdoo DJ (1991a) Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res* 547:344–348.
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991b) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807–815.
- Liu D, Xu GY, Pan E, McAdoo DJ (1999) Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience* 93:1383–1389.
- López-Vales R, Forés J, Navarro X, Verdú E (2006) Olfactory ensheathing glia graft in combination with FK506 administration promote repair after spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 24:443–454.
- López-Vales R, García-Allas G, Forés J, Udina E, Gold BG, Navarro X, Verdú E (2005) FK 506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* 81:827–836.
- Lowenstein DH, Chan PH, Miles MF (1991) The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity. *Neuron* 7:1053–1060.
- Lu J, Ashwell KW, Waite P (2000) Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine* 25:1859–1866.
- Madsen JR, MacDonald P, Irwin N, Goldberg DE, Yao GL, Meiri KF, Rimm IJ, Stieg PE, Benowitz LI (1998) Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 154:673–683.
- Manzerra P, Brown IR (1992) Expression of heat shock genes (hsp70) in the rabbit spinal cord: localization of constitutive and hyperthermia-inducible mRNA species. *J Neurosci Res* 31:606–615.
- Mautes AE, Noble LJ (2000) Co-induction of HSP70 and heme oxygenase-1 in macrophages and glia after spinal cord contusion in the rat. *Brain Res* 883:233–237.
- McAdoo DJ, Xu GY, Robak G, Hughes MG (1999) Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp Neurol* 159:538–544.
- McLaughlin SH, Smith HW, Jackson SE (2002) Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. *J Mol Biol* 315:787–798.
- Moore PL, MacCoubrey IC, Haugland RP (1990) A rapid, pH insensitive, two color fluorescence viability (cytotoxicity) assay. *J Cell Biol* 111:[Abstract No. 304].
- Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12:3788–3796.
- Muramoto M, Yamazaki T, Nishimura S, Kita Y (2003) Detailed in vitro pharmacological analysis of FK506-induced neuroprotection. *Neuropharmacology* 45:394–403.
- Panter SS, Yum SW, Faden AI (1990) Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol* 27:96–99.
- Park E, Velumian AA, Fehlings MG (2004) The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma* 21:754–774.
- Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999) Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chap-

- erone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* 42:260–266.
- Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6591–6595.
- Sasaki T, Hamada J, Shibata M, Gotoh J, Araki N, Fukuuchi Y (2004) FK506 abrogates delayed neuronal death via suppression of nitric oxide production in rats. *Brain Res* 1009:34–39.
- Sato K, Matsuki N (2002) A 72 kDa heat shock protein is protective against the selective vulnerability of CA1 neurons and is essential for the tolerance exhibited by CA3 neurons in the hippocampus. *Neuroscience* 109:745–756.
- Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, Hanisch UK (2006) Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 29:68–74.
- Shaked I, Tchoresh D, Gersner R, Meiri G, Mordechai S, Xiao X, Hart RP, Schwartz M (2005) Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J Neurochem* 92:997–1009.
- Steiner JP, Connolly MA, Valentine HL, Hamilton GS, Dawson TM, Hester L, Snyder SH (1997) Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nat Med* 3:421–428.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173–182.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563–581.
- Tator CH, Fehlings MG (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75:15–26.
- Tsang YM, Chiong F, Kuznetsov D, Kasarskis E, Geula C (2000) Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments: cross-species comparison and alterations in ALS. *Brain Res* 861:45–58.
- Udina E, Ceballos D, Verdú E, Gold BG, Navarro X (2002) Bimodal dose-dependence of FK506 on the rate of axonal regeneration in mouse peripheral nerve. *Muscle Nerve* 26:348–355.
- Udina E, Rodriguez FJ, Verdú E, Espejo M, Gold BG, Navarro X (2004) FK506 enhances regeneration of axons across long peripheral nerve gaps repaired with collagen guides seeded with allogeneic Schwann cells. *Glia* 47:120–129.
- Wang MS, Gold BG (1999) FK506 increases the regeneration of spinal cord axons in a predegenerated peripheral nerve autograft. *J Spinal Cord Med* 22:287–296.
- Wang MS, Zeleny-Pooley M, Gold BG (1997) Comparative dose-dependence study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1084–1093.
- Wilde GJ, Pringle AK, Sundstrom LE, Mann DA, Iannotti F (2000) Attenuation and augmentation of ischaemia-related neuronal death by tumour necrosis factor-alpha in vitro. *Eur J Neurosci* 12:3863–3870.
- Xu GY, McAadoo DJ, Hughes MG, Robak G, de Castro R Jr (1998) Considerations in the determination by microdialysis of resting extracellular amino acid concentrations and release upon spinal cord injury. *Neuroscience* 86:1011–1021.
- Zawadzka M, Kaminska B (2003) Immunosuppressant FK506 affects multiple signaling pathways and modulates gene expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 22:202–209.
- Zawadzka M, Kaminska B (2005) A novel mechanism of FK506-mediated neuroprotection: downregulation of cytokine expression in glial cells. *Glia* 49:36–51.

# III

## **Análisis del efecto neuroprotector y neuritogénico de PRE084, agonista del receptor Sigma-1**



Esta tercera sección de los resultados sigue con el uso del modelo organotípico de lesión excitotóxica para el ensayo de nuevos fármacos de potencial efecto neuroprotector; particularmente, un agonista del receptor sigma-1 (Sig1R), el 2-(4-morpholinethyl)1-phenylcyclohexanecarboxylate o PRE084, el cual mostró ser neuroprotector en este tipo de lesiones y tener efectos neuritogénicos.

Estudios previos han demostrado que ligandos del receptor Sig1R evitan la muerte neuronal asociada a excitotoxicidad por glutamato en modelos *in vitro* y en modelos *in vivo* de isquemia cerebral (Nishikawa et al., 2000; Kume et al., 2002), por lo cual decidimos probar si el agonista de Sig1R, PRE084, ejercía neuroprotección en explantes de médula espinal sometidos a una lesión excitotóxica por glutamato. Además, como la vía de señalización de PKC ha sido implicada en la modulación de la liberación de dopamina y en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  mediada por agonistas del Sig1R, también evaluamos si PKC estaba involucrada en los efectos observados de PRE084.

Por otro lado, como PRE084 estaba promoviendo elongación de neuritas y neuroprotección, procesos en los que se ha descrito que se encuentra involucrado el factor de transcripción CREB, decidimos evaluar su participación en tales efectos.

Los trabajos incluidos en esta sección son:

**Artículo 3.** Selective Sigma Receptor Agonist PRE084 Promotes Neuroprotection and Neurite Elongation Through PKC Signaling on Motoneurons  
(Manuscrito)

**Anexo V.** Variación de la viabilidad celular de los cultivos de ganglios de la raíz dorsal tratados con PRE084, BD1063 y *chelerythrine*.

**Anexo VI.** Cambios en la expresión del receptor sigma-1 en organotípicos de médula espinal.

**Anexo VII.** Los niveles de pCREB en explantes de DRG y cultivos organotípicos de médula espinal no varían con el tratamiento de PRE084.





## **Selective Sigma Receptor Agonist PRE084 Promotes Neuroprotection and Neurite Elongation Through PKC Signaling on Motoneurons**

Mónica-Sofía Guzmán-Lenis, Xavier Navarro, Caty Casas

Group of Neuroplasticity and Regeneration, Institute of Neurosciences and Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain.

*Corresponding author:* Dra. Caty Casas, Unitat de Fisiologia Mèdica, Edif. M, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Spain.

Tel: +34-935811348/1966, Fax: +34-935812986

E-mail: [caty.casas@uab.cat](mailto:caty.casas@uab.cat)

Number of pages: 25

Number of figures: 5

Number of references: 46

Number of words in abstract: 204

Number of words in introduction: 450

Number of words in discussion: 865

### Nonstandard abbreviations

Sig-1R, Sigma-1 receptor; IP<sub>3</sub>R, inositol 1,4,5-triphosphate receptors; PRE-084, 2-(4-morpholinethyl)1-phenylcyclohexanecarboxylate; EthD, ethidium homodimer-1; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NMDA, N-methyl-D-aspartic acid; MN, motoneuron; PKC, protein kinase C; HBSS, Hanks balanced salt solution; BD1063, 1-[2-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]-4-methylpiperazine dihydrochloride; DRG, dorsal root ganglia; PLC, phospholipase C; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; DIV, days *in vitro*.

**ABSTRACT**

Neuronal loss and interruption of axonal pathways are occurring after spinal cord injury. This is initiated by the mechanical damage and propagated by secondary events that include the fast rise of glutamate concentration and the subsequent over-activation of glutamate receptors, triggering noxious processes to the cell. Excitotoxic processes are also observed in degenerative diseases that involve motoneuron loss. Sigma-1 receptors (Sig-1Rs) are expressed in the CNS and their ligands have been shown to prevent neuronal death associated to glutamate toxicity. In the present study, we used organotypic cultures of spinal cord slices and dorsal root ganglia (DRG) explants to assess whether the agonist of the Sig-1R, PRE084, protects the spinal cord against glutamate excitotoxicity and promotes neurite elongation. The results showed that PRE084 exerted a bell-shape dose-dependent protective response of the motoneurons, with a significative neuroprotection obtained with 10  $\mu$ M PRE084. PRE084 also caused an increase in the length of neurites in both motoneurons and neurons in DRG explants. Both effects were abrogated with the addition of BD1063, an antagonist of Sig-1R, and the use of chelerythrine, a PKC pan-inhibitor indicating that PKC is involve in the observed effects. These results suggest the use of PRE084 as a neuroprotective agent for spinal cord damage.

## INTRODUCTION

Loss of motor functions following spinal cord injury (SCI) reflects the interruption of axonal pathways and the loss of motoneurons (MNs) at the injured cord segments (Collazos-Castro et al., 2005; Garcia-Alias et al., 2006). After SCI, neuronal death is initiated by the mechanical damage and propagated by a cascade of harmful secondary events that include posttraumatic ischemia, formation of free radicals and glutamate excitotoxicity (Lu et al., 2000; Sekhon and Fehlings, 2001). Within minutes following SCI, the concentrations of glutamate rapidly rise (Liu et al., 1991; McAdoo et al., 1999) triggering the uncontrolled activation of glutamate receptors and the initiation of deleterious processes leading to cell death. This glutamate excitotoxicity is a relevant mechanism for MN degeneration (Lipton and Rosenberg, 1994), and it plays an important role also in the neurodegenerative processes associated with motoneuron diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Vajda, 2002). Several studies have pointed out the importance of neuroprotective therapeutical approaches to reduce the loss of MNs after traumatic injury (Nakajima et al., 2007; Teng et al., 1999), as well as in neurodegenerative processes affecting the spinal cord.

Sigma-1 receptor (Sig-1R) is a brain-enriched endoplasmic reticulum (ER) protein (Alonso et al., 2000; McCann and Su, 1990), highly expressed in MNs and neurons of the dorsal horn in the spinal cord (Alonso et al., 2000). Sig-1R has been involved in several physiological cellular events (Su and Hayashi, 2003), such as the regulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptors (IP<sub>3</sub>R) and Ca<sup>2+</sup> signalling at the ER (Hayashi et al., 2000; Hayashi and Su, 2001; Hong et al., 2004), ion channels at the plasma membrane including Kv1.4 channels and NMDA receptors and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels (Aydar et al., 2002; Hayashi and Su, 2001; Monnet, 2005). Ligands of Sig-1R have been shown to prevent neuronal death associated with glutamate toxicity *in vitro* and on *in vivo* brain ischemia models (Kume et al., 2002; Nishikawa et al., 2000; Takahashi et al., 1995) although the mechanisms involved are little known.

By using organotypic cultures of spinal cord and of dorsal root ganglia we have analysed the neuroprotective and the effects on neurite outgrowth of 2-(4-morpholinethyl)1-phenylcyclohexanecarboxylate (PRE-084), a selective ligand of Sig-1R, and investigated the signalling cascade involved. We have found that PKC signalling was involved in those effects exerted by PRE084.

## **MATERIALS AND METHODS**

### Organotypic spinal cord slice cultures

Organotypic slice cultures were prepared from Sprague Dawley rats of postnatal day 7 (P7) using a modification (Guzman-Lenis et al., 2008) of previously described methods (Rothstein et al., 1993) Briefly, pups were over-exposed to CO<sub>2</sub> and decapitated. The thoracic segment of their spinal cord was removed and placed in ice-cold high glucose (6 mg/ml) Hanks balanced salt solution (HBSS) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Under sterile conditions, meninges and roots were removed and the spinal cord was sectioned into 350 µm slices with a McIlwain Tissue Chopper (Gomshall, Surrey, UK). Up to 5 sections were carefully transferred onto Millicell-CM (Millipore, Bedford, USA) culture plate inserts and placed into a 6-well plate (Iwaki, Asahi techno glass, Chiba, Japan) containing 1.5 ml of Neurobasal medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) with 1X B27 (Gibco), 2 mM glutamine, 6 mg/ml glucose and antibiotics (100 UI/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin), and incubated 24h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The following day, the medium was changed to remove antibiotics and incubated for the next 6 days to stabilize the culture. The medium was changed twice per week until 15 days *in vitro* (DIV). All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee of our institution, and followed the European Communities Council Directive 86/609/EEC.

### Excitotoxic injury

Two-week-old spinal cord slices were placed on modified Locke's buffer (137 mM NaCl; 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 5.6 mM D-Glucosa; 0.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.01 mM Glycine; 10 mM HEPES) with 50 µM glutamate, and incubated for 30 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. We have previously shown that this concentration of glutamate induces above 50% cell death in the spinal cord slices two days after the insult, when compared with those submitted to long-term cold stress (4°C for 24h) (Guzman-Lenis et al., 2008). After washing out glutamate traces with warm medium, the inserts were finally transferred to warm-fresh medium with or without 2-(4-morpholinethyl)1-phenylcyclohexanecarboxylate, PRE084 (Tocris, Ellisville, MO, USA), BD1063 (Tocris) or Chelerritine (5 µM, Sigma) and incubated for 24 or 48h. Sham-control samples were manipulated in the same way without the addition of glutamate.

### Viability test

Global cell death on cultured slices was assessed by cellular uptake of ethidium homodimer-1 (EthD) (Live/Death viability assay, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) after incubation with 1.5  $\mu$ M EthD for 24h. EthD is a fluorescent probe whose intensity rises up to 40-fold when binding to the DNA in damaged cells (Glazer et al., 1990). Images were taken with the aid of a digital camera (Olympus C-5050) attached to a fluorescence microscope (Olympus BX-70) using a 10x objective. The analysis was done with the ImageJ software (U.S. National Institutes of Health) by adjusting the threshold above the background. The integrated density was measured and used to calculate cell death expressed as percentage of EthD uptake with the formula: % EthD uptake =  $(D_{\text{treat}} / D_{\text{max}}) \times 100$ , where  $D_{\text{treat}}$  is the integrated density of the treated slice and  $D_{\text{max}}$  is the integrated density of the slice incubated at 4°C for 24h, which corresponds to 100% cellular death (Adamchik et al., 2000).

#### DRG explant culture

The experimental procedure followed the protocol described by Kosacka et al. (2005). P7 rats were euthanized by over-exposure to CO<sub>2</sub> and decapitated. DRGs were isolated from both sides of the spinal cord and collected in cold Hank's solution with Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>. The ganglia were treated with 0.1% collagenase (Sigma) at 37°C for 30 minutes to remove the connective tissue, rinsed with Hank's solution, placed on 13 mm coverslips coated with 0.01mg/ml poly-D-Lysine (Sigma) and 10% Vitrogen 100 (Collagen Corp, Palo Alto, CA, USA), and incubated at 37°C for 30 minutes with 50  $\mu$ l of culture medium (Neurobasal medium plus B27 1X, 2 mM glutamine, 6 mg/ml glucose and antibiotics) to allow attachment of the ganglia. Then the explants were covered with culture medium with or without the different drugs and incubated in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 3 days.

#### Immunohistochemistry

Cultured slices were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA), rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and, after blocking with 3% bovine serum and 0.3% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl at pH 7.4 (TBS), incubated with primary antibody overnight at 4°C. Primary antibodies used were: SMI32 (Stenberger Monoclonals, Baltimore, MD, USA) and anti-Sig-1R (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). DRG explants were fixed with warm PFA (4%), rinsed with PBS and incubated with anti- $\beta$ III-tubulin (TUJ1) (Covance, Berkeley, CA, USA) overnight at 4°C.

Incubation with secondary antibodies Cy3 anti-mouse and Cy2 anti-rabbit (Jackson, West Grove, PA, USA) was made overnight at 4°C. After several washings, slices and DRG explants were dehydrated and mounted with DPX (Fluka, Buchs, Switzerland). Immunolabeled samples were observed with an Olympus BX-51 epifluorescence microscopy equipped with a digital camera, and processed with Photoshop (Adobe, San Jose, CA, USA).

#### Neurite length assessment

When necessary, composite images were made with Photoshop to include the full extent of neurite extension. The length of 20-30 neurites from each DRG explant was measured using ImageJ software. The length measured for each neurite was the distance from the end of the neurite straight back to the DRG body radially (Deister and Schmidt, 2006). In the spinal cord slices, the neurite length was measured following the neurite from the neuronal body to its tip end, and it was done on at least 10 MNs per slice (n = 10-15). All the images were analysed with the NeuronJ plugin of the ImageJ software

#### Statistical analysis

Each experimental condition contains spinal cord slices or DRG explants harvested on at least three different days, with 4-5 slices for spinal cord organotypic cultures and four animals for DRG explants used every day. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Bonferroni's post-test for multiple comparisons using GraphPad Prism version 4.0b for Macintosh (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## RESULTS

We first analyzed the expression of Sig-1R in the spinal cord organotypic culture by immunocytochemistry. Sig-1R was present in ventral (Fig. 1A) as well as in dorsal horn neuronal cells as confirmed by co-labelling with the neural marker PGP9.5 (Fig. 1B-D). Within the neurons, Sig-1R was mainly localized in the soma, with the highest density around the nucleus, and in minority along the neurites.

We assessed the potential of PRE084, a specific Sig-1R ligand, as neuroprotector against glutamatergic excitotoxic damage induced to the spinal cord organotypic cultures by measuring the amount of EthD uptake by the cells. As shown in figure 2, slices treated with 50  $\mu$ M glutamate presented an increase in EthD uptake of 49.2% compared with non-injured slices (Fig. 2A, B). Addition of PRE084 to the damaged slices reduced the percentage of EthD uptake by the cells in a dose-dependent manner, with a maximum protective effect obtained at 50  $\mu$ M PRE084 (reduction of EthD uptake to 27.3%) (Fig. 2 C-E, H). This effect was abrogated by the concomitant addition of a selective Sig-1R antagonist, BD1063 (Fig 2F).

We also assessed the effect of PRE084 treatment on MN survival by counting the number of SMI32-positive neurons in the ventral horns of the cultures. The number of surviving MNs in slices subjected to excitotoxic damage decreased by 85% compared with control slices (Fig. 3B, G). Treatment with PRE084 reduced MN death caused by glutamate with a bell-shape dose-dependent response (Fig. 3C-E, G). The highest neuroprotection (83% of MNs surviving) was obtained with 10  $\mu$ M PRE084. Again, co-administration of the antagonist BD1063 abolished this neuroprotective effect (Fig. 3F, G). Addition of PRE084 to non-injured slices did not affect EthD uptake nor the motoneuronal counts in the organotypic cultures (data not shown).

Because we observed in non-injured PRE084-treated slices a larger bundle of knotted axons than in untreated slices, we assessed whether the Sig-1R agonist might influence neurite growth. MNs showed significantly longer neurites in slices treated with PRE084 than in controls (Fig. 4A-C, G). In DRG explants treated with different concentrations of PRE084 the average length of the longest neurites was increased in comparison to untreated DRGs (Fig. 4D-F, H). The maximal neurite length was achieved with 10  $\mu$ M PRE084, which increased from  $1142 \pm 45$  to  $1553 \pm 48$   $\mu$ m (36% increase) the neurite length of sensory neurons (Fig. 4H). Again, the addition of BD1063 reverted the neuritogenic effect of PRE084. PRE084 treatment did not affect neuronal cell survival in the DRG cultures.

Since PKC signalling pathway has been implicated in Sig-1R agonist modulation of dopamine release and ER calcium homeostasis (Monnet et al., 2003; Nuwayhid and Werling, 2003), we evaluated whether PKC was involved in the observed effects of PRE084. We found that co-administration of a PKC pan-inhibitor, chelerythrine (5  $\mu$ M) abolished the increased neurite extension induced with PRE084 in both spinal cord slices and DRG explants (Fig. 4G, H). Similarly, chelerythrine co-treatment partially reverted the tissue protective effects exerted by PRE084 and completely prevented the MN protection achieved by the Sig-1R agonist (Fig. 5). Although it has been reported that high doses of the PKC inhibitor chelerythrine can trigger apoptosis through other PKC-independent mechanisms (Yu et al., 2000), this does not seem our case since the doses used did not produce significant MN death in the spinal cord slices (Fig. 5F).



## DISCUSSION

The results of this study show that the Sig-1R agonist PRE084 reduces the toxicity induced by glutamate to spinal cord organotypic cultures and promotes the elongation of neurites of both MNs and DRG neurons through PKC-mediated signaling.

Numerous studies have demonstrated neuroprotective properties of Sig-1R ligands in animal models of cerebral ischemia (Goyagi et al., 2001; Goyagi et al., 2003; Harukuni et al., 2000; Kume et al., 2002; Nishikawa et al., 2000; Takahashi et al., 1995). Although the mechanisms involved are still unknown, several possibilities have been pointed out. Sig-1R ligands affect both the influx and efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cells through modulation of intra-synaptosomal free  $\text{Ca}^{2+}$  levels or of *N*-methyl-D-aspartate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signalling (Hayashi et al., 1995; Klette et al., 1997) or by its interaction with  $\text{IP}_3\text{R}$  attached to the ER to alter intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Hayashi and Su, 2001; Hayashi and Su, 2007). Glutamate excitotoxicity activates the influx of calcium into the cells, primarily by stimulating the ionotropic glutamate receptors NMDA or AMPA/Kainate. The resulting increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  produces free radicals by acting on neuronal mitochondria, where it activates calcium/dependent superoxide generating enzymes, or by activating neuronal nitric oxide synthase (nNOS), which produces nitric oxide (Lafon-Cazal et al., 1993; Urushitani et al., 1998). The modulatory action of Sig-1R agonists on the NMDA receptor has been described as the cause of their neuroprotective effects on other excitotoxic cellular models (DeCoster et al., 1995; Senda et al., 1998; Tchedre and Yorrio, 2008). However, in contrast to those experiments, we added the Sig-1R agonist to the cultures with delay after the glutamate insult. Thus, it is unlikely that the observed neuroprotective effects of PRE084 in our model are due to the simultaneous and direct interaction of Sig-1R with NMDA receptor, although this interaction might be important during sustained excitotoxic insults. The most probable mechanism of action of the Sig-1R ligand seems to be targeting NMDA downstream events, considering that in our model most of the cytotoxicity is mediated through NMDA receptors (Guzman-Lenis et al., 2008). In this regard, PKC activation is linked to inhibition of NMDA-stimulated downstream  $\text{Ca}^{2+}$  changes (Snell et al., 1994), and we have shown that this signalling cascade is necessary to achieve neuroprotection by PRE084.

Another possibility to cope with the unbalance in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis may be by modulating its efflux from different organelles. On the one hand, it has been described that Sig-1R can interact with ankyrin in the ER membrane, which controls the intracellular sorting of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis proteins such as the  $\text{IP}_3\text{R}$  (Hayashi and Su, 2001). In front of specific stimulus

such as bradykinin, that potentiates the efflux of  $\text{Ca}^{2+}$  from the ER, Sig-1R agonists promote the dissociation of the ankirin-IP<sub>3</sub>R complex enhancing this effect (Hayashi and Su, 2001). More recently, it has been reported that Sig-1R acts as a “ligand-operated” chaperone that specifically targets mitochondrion-associated ER membrane (MAM). Hayashi and Su (2007) found that Sig-1Rs form a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive chaperone machinery with an ER-chaperon called BiP, and prolong  $\text{Ca}^{2+}$  signaling from ER into mitochondria by stabilizing IP<sub>3</sub>Rs at MAM. Thus, Sig-1R might act reducing  $\text{Ca}^{2+}$  overload into the different organelles promoting its redistribution. In this regard, PKC is involved in facilitating mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  release. Thus, inhibiting PKC might block the loop of  $\text{Ca}^{2+}$  redistribution triggered by Sig-1R agonist, which would account for the reduced neuroprotection observed in our culture model when using a PKC inhibitor. Recently, Kim et al (2008) published that PRE-084 and other Sig-1R ligands act dose-dependently enhancing pNR1 expression mediated by PKC. The phosphorylation of this subunit prevents the increase in NMDA receptor activity (Bickler et al., 2004). Again, since we treated the spinal cord slices with the agonist after the overactivation of NMDA receptors by glutamate, this mechanism is unlikely to mediate the neuroprotective effect observed.

Our results also show that PRE084 has a potent effect promoting neurite outgrowth on both MNs of spinal cord slices and sensory neurons of DRG explants. It has been previously described that some Sig-1R ligands, such as (+)-pentazocine, imipramine and fluvoxamine, stimulated NGF-mediated neurite sprouting and growth on PC-12 cells (Nishimura et al., 2008; Takebayashi et al., 2002). Our results support those reports but, in contrast to the studies performed on PC-12 cells, we found a direct effect of the Sig-1R ligand agonist without the addition of neurotrophic growth factor (NGF) to the media. We have confirmed that PKC mediates also the effect of Sig-1R in enhancing neurite growth, although we can not rule out that other cascades might be implicated, including phospholipase C (PLC-c), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), p38MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), and Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway (Nishimura et al., 2008).

In conclusion, the Sig-1R agonist PRE-084 seems a promising drug to be tested for the treatment of SCI and other neurodegenerative diseases affecting the spinal cord in which excitotoxicity plays a central role. In addition to its neuroprotective effects, PRE-084 has a significant pro-regenerative action, thus offering an interesting combination of actions in order to reduce neuronal damage and also to enhance regrowth of axonal pathways across the lesion site.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Dr. José M Vela for fruitful discussions. This research was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2006-08682) and the Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060201) of Spain, and funds from CIBERNED and TERCEL, Spain, and FEDER. Part of this work was previously presented as a poster at the Meeting of the Sociedad Española de Neurociencias 2007.

**REFERENCES**

- Adamchik Y, Frantseva MV, Weisspapir M, Carlen PL, Perez Velazquez JL. (2000) Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc* **5**:153-158.
- Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaal M, Maurice T. (2000) Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* **97**:155-170.
- Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA, Jackson MB. (2002) The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* **34**:399-410.
- Bickler PE, Fahlman CS, Ferriero DM. (2004) Hypoxia increases calcium flux through cortical neuron glutamate receptors via protein kinase C. *J Neurochem* **88**:878-884.
- Collazos-Castro JE, Soto VM, Gutierrez-Davila M, Nieto-Sampedro M. (2005) Motoneuron loss associated with chronic locomotion impairments after spinal cord contusion in the rat. *J Neurotrauma* **22**:544-558.
- DeCoster MA, Klette KL, Knight ES, Tortella FC. (1995) Sigma receptor-mediated neuroprotection against glutamate toxicity in primary rat neuronal cultures. *Brain Res* **671**:45-53.
- Deister C and Schmidt CE. (2006) Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth. *J Neural Eng* **3**:172-179.
- Garcia-Alias G, Valero-Cabre A, Lopez-Vales R, Fores J, Verdu E, Navarro X. (2006) Differential motor and electrophysiological outcome in rats with mid-thoracic or high lumbar incomplete spinal cord injuries. *Brain Res* **1108**:195-204.
- Glazer AN, Peck K, Mathies RA. (1990) A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: Application to picogram fluorescence detection of DNA in agarose gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:3851-3855.
- Goyagi T, Bhardwaj A, Koehler RC, Traystman RJ, Hurn PD, Kirsch JR. (2003) Potent sigma 1-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine provides ischemic neuroprotection without altering dopamine accumulation in vivo in rats. *Anesth Analg* **96**:532-8, table of contents.
- Goyagi T, Goto S, Bhardwaj A, Dawson VL, Hurn PD, Kirsch JR. (2001) Neuroprotective effect of sigma(1)-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) is linked to reduced neuronal nitric oxide production. *Stroke* **32**:1613-1620.

- Guzman-Lenis MS, Vallejo C, Navarro X, Casas C. (2008) Analysis of FK506-mediated protection in an organotypic model of spinal cord damage: Heat shock protein 70 levels are modulated in microglial cells. *Neuroscience* .
- Harukuni I, Bhardwaj A, Shaivitz AB, DeVries AC, London ED, Hurn PD, Traystman RJ, Kirsch JR, Faraci FM. (2000) Sigma(1)-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl)-piperidine affords neuroprotection from focal ischemia with prolonged reperfusion. *Stroke* **31**:976-982.
- Hayashi T, Kagaya A, Takebayashi M, Shimizu M, Uchitomi Y, Motohashi N, Yamawaki S. (1995) Modulation by sigma ligands of intracellular free  $Ca^{++}$  mobilization by N-methyl-D-aspartate in primary culture of rat frontal cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **275**:207-214.
- Hayashi T, Maurice T, Su TP. (2000)  $Ca^{2+}$  signaling via sigma(1)-receptors: Novel regulatory mechanism affecting intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. *J Pharmacol Exp Ther* **293**:788-798.
- Hayashi T and Su TP. (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate  $Ca^{2+}$  signaling and cell survival. *Cell* **131**:596-610.
- Hayashi T and Su TP. (2001) Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:491-496.
- Hong W, Nuwayhid SJ, Werling LL. (2004) Modulation of bradykinin-induced calcium changes in SH-SY5Y cells by neurosteroids and sigma receptor ligands via a shared mechanism. *Synapse* **54**:102-110.
- Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Seo HS, Kwon YB, Han HJ, Kim KW, Beitz AJ, Lee JH. (2008) Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *Br J Pharmacol*
- Klette KL, Lin Y, Clapp LE, DeCoster MA, Moreton JE, Tortella FC. (1997) Neuroprotective sigma ligands attenuate NMDA and trans-ACPD-induced calcium signaling in rat primary neurons. *Brain Res* **756**:231-240.
- Kosacka J, Figiel M, Engele J, Hilbig H, Majewski M, Spaniel-Borowski K. (2005) Angiopoietin-1 promotes neurite outgrowth from dorsal root ganglion cells positive for tie-2 receptor. *Cell Tissue Res* **320**:11-19.
- Kume T, Nishikawa H, Taguchi R, Hashino A, Katsuki H, Kaneko S, Minami M, Satoh M, Akaike A. (2002) Antagonism of NMDA receptors by sigma receptor ligands

- attenuates chemical ischemia-induced neuronal death in vitro. *Eur J Pharmacol* **455**:91-100.
- Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* **364**:535-537.
- Lipton SA and Rosenberg PA. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* **330**:613-622.
- Liu D, Thangnipon W, McAdoo DJ. (1991) Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res* **547**:344-348.
- Lu J, Ashwell KW, Waite P. (2000) Advances in secondary spinal cord injury: Role of apoptosis. *Spine* **25**:1859-1866.
- McAdoo DJ, Xu GY, Robak G, Hughes MG. (1999) Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp Neurol* **159**:538-544.
- McCann DJ and Su TP. (1990) Haloperidol-sensitive (+)[3H]SKF-10,047 binding sites (sigma sites) exhibit a unique distribution in rat brain subcellular fractions. *Eur J Pharmacol* **188**:211-218.
- Monnet FP. (2005) Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca<sup>2+</sup>: Clinical and therapeutic relevance. *Biol Cell* **97**:873-883.
- Monnet FP, Morin-Surun MP, Leger J, Combettes L. (2003) Protein kinase C-dependent potentiation of intracellular calcium influx by sigma1 receptor agonists in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **307**:705-712.
- Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, Inukai T, Horiuchi Y, Yayama T, Sato R, Baba H. (2007) Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene. *J Neurotrauma* **24**:703-712.
- Nishikawa H, Hashino A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Akaike A. (2000) Involvement of direct inhibition of NMDA receptors in the effects of sigma-receptor ligands on glutamate neurotoxicity in vitro. *Eur J Pharmacol* **404**:41-48.
- Nishimura T, Ishima T, Iyo M, Hashimoto K. (2008) Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: Role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways. *PLoS ONE* **3**:e2558.
- Nuwayhid SJ and Werling LL. (2003) Sigma1 receptor agonist-mediated regulation of N-methyl-D-aspartate-stimulated [3H]dopamine release is dependent upon protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:364-369.

- Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW. (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6591-6595.
- Sekhon LH and Fehlings MG. (2001) Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* **26**:S2-12.
- Senda T, Mita S, Kaneda K, Kikuchi M, Akaike A. (1998) Effect of SA4503, a novel sigma1 receptor agonist, against glutamate neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. *Eur J Pharmacol* **342**:105-111.
- Snell LD, Iorio KR, Tabakoff B, Hoffman PL. (1994) Protein kinase C activation attenuates N-methyl-D-aspartate-induced increases in intracellular calcium in cerebellar granule cells. *J Neurochem* **62**:1783-1789.
- Su TP and Hayashi T. (2003) Understanding the molecular mechanism of sigma-1 receptors: Towards a hypothesis that sigma-1 receptors are intracellular amplifiers for signal transduction. *Curr Med Chem* **10**:2073-2080.
- Takahashi H, Kirsch JR, Hashimoto K, London ED, Koehler RC, Traystman RJ. (1995) PPBP [4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine], a potent sigma-receptor ligand, decreases brain injury after transient focal ischemia in cats. *Stroke* **26**:1676-1682.
- Takebayashi M, Hayashi T, Su TP. (2002) Nerve growth factor-induced neurite sprouting in PC12 cells involves sigma-1 receptors: Implications for antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:1227-1237.
- Tchedre KT and Yorio T. (2008) Sigma-1 receptors protect RGC-5 cells from apoptosis by regulating intracellular calcium, bax levels, and caspase-3 activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**:2577-2588.
- Teng YD, Mochetti I, Taveira-DaSilva AM, Gillis RA, Wrathall JR. (1999) Basic fibroblast growth factor increases long-term survival of spinal motor neurons and improves respiratory function after experimental spinal cord injury. *J Neurosci* **19**:7037-7047.
- Urushitani M, Shimohama S, Kihara T, Sawada H, Akaike A, Ibi M, Inoue R, Kitamura Y, Taniguchi T, Kimura J. (1998) Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: Involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. *Ann Neurol* **44**:796-807.
- Vajda FJ. (2002) Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci* **9**:4-8.

Yu R, Mandlekar S, Tan TH, Kong AN. (2000) Activation of p38 and c-jun N-terminal kinase pathways and induction of apoptosis by chelerythrine do not require inhibition of protein kinase C. *J Biol Chem* 275:9612-9619.



**FIGURE LEGENDS**

**Figure 1.** Localization of Sig-1R in neurons of the spinal cord explants. A, Microphotograph showing the ventral horn of a 15 DIV cultured spinal cord slice with Sig-1R fluorescent immunoreactivity. Note the presence of the receptor in motoneurons (arrow) and in other cell population, probably oligodendrocytes (arrow head). B-C, Images of single labeled and merged microphotographs, showing co-localization of Sig-1R immunoreactivity (B) with PGP9.5 neuronal labeling (C) of a spinal motoneuron. Scale bars: 200 $\mu$ m in A and 20  $\mu$ m in B-D.

**Figure 2.** Spinal cord slice neuroprotection mediated by PRE084. A-G, Representative microphotographs digitized to show the degree of EthD uptake by whole spinal cord slice cultures untreated (A), or exposed to glutamate (Glu) 50  $\mu$ M (B-G) at 15 DIV. Some slices were further exposed to different concentrations (1-50  $\mu$ M) of PRE084 (C-E) or to a combination of 50  $\mu$ M PRE084 with 5  $\mu$ M of the sigma receptor antagonist BD1063 (F) after the insult. The percentage of EthD uptake was estimated with respect to the maximum fluorescent obtained in slices submitted to 4°C overnight (G). H, Histogram representing the percentage of EthD uptake in controls (C), in slices exposed to 50  $\mu$ M glutamate alone (G) or followed by the addition of different concentrations of PRE084 or PRE084 plus BD1063 (n=16-32). \* p<0.01, # p<0.01 vs control, ### p<0.001 vs control.

**Figure 3.** Organotypic spinal cord culture neuroprotection mediated by PRE084. Microphotographs of ventral SMI32-positive motoneurons in control spinal cord slices (CON) (A), after exposure to 50  $\mu$ M glutamate (GLU) (B), to 50  $\mu$ M glutamate followed by addition of PRE084 at 1  $\mu$ M (C), 10  $\mu$ M (D) and 50  $\mu$ M (E), or to a combination of PRE084 10  $\mu$ M and 5  $\mu$ M BD1063 (ANT). Bar histogram showing the average number  $\pm$  SEM of SMI32-positive neuronal cells surviving in the slices in the different conditions (n=16-32) (E). \* P<0.001, # P<0.01 vs control, ### P<0.001 vs control.

**Figure 4.** Representative microphotographs showing the neuritogenic effect of PRE084 on spinal cord slices (A-C) and DRG explants (D-F). Cultures were untreated (A and D), treated with PRE084 10  $\mu$ M (B and E), and with PRE084 10 $\mu$ M and Chelerythrine (Ch) 5  $\mu$ M (C and F). Histograms showing the average number  $\pm$  SEM of measured neurite length in micrometers in (G) spinal cord slices motoneurons (n= 10-15; at least 10 MN neurites

measured on each slice) and (H) in DRG cultures (n= 10-20; for each one DRG explant 20-30 neurites were measured ). \* p< 0.01, \*\* p< 0.001.

**Figure 5.** Representative microphotographs showing the effect of the inhibition of PKC on PRE084 treated slices. Left column, digitized representative microphotographs of fluorescent rat spinal cord slices used to quantify the degree of EthD uptake, and Right column, microphotographs of ventral SMI32-positive motoneurons in either control slices (CON) (A), exposed to 50  $\mu$ M glutamate (GLU) (B) or to 50  $\mu$ M glutamate followed by addition of PRE084 at 50  $\mu$ M (C), or glutamate followed by addition of PRE084 50  $\mu$ M and Chelerythrine 5  $\mu$ M (D). Histograms representing the percentage of EthD uptake (n=16-32) (E), and the average number  $\pm$  SEM of SMI32-positive neuronal cells surviving in the slices (n= 16-32) (F). \* P<0.01 and # P<0.05, ## P<0.01 with respect to control slices.

Figure 1

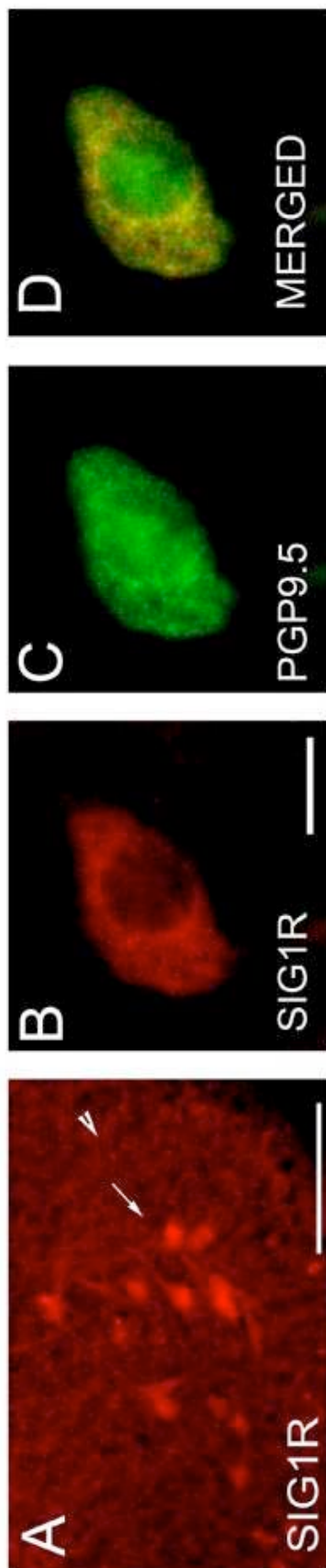


Figure 2

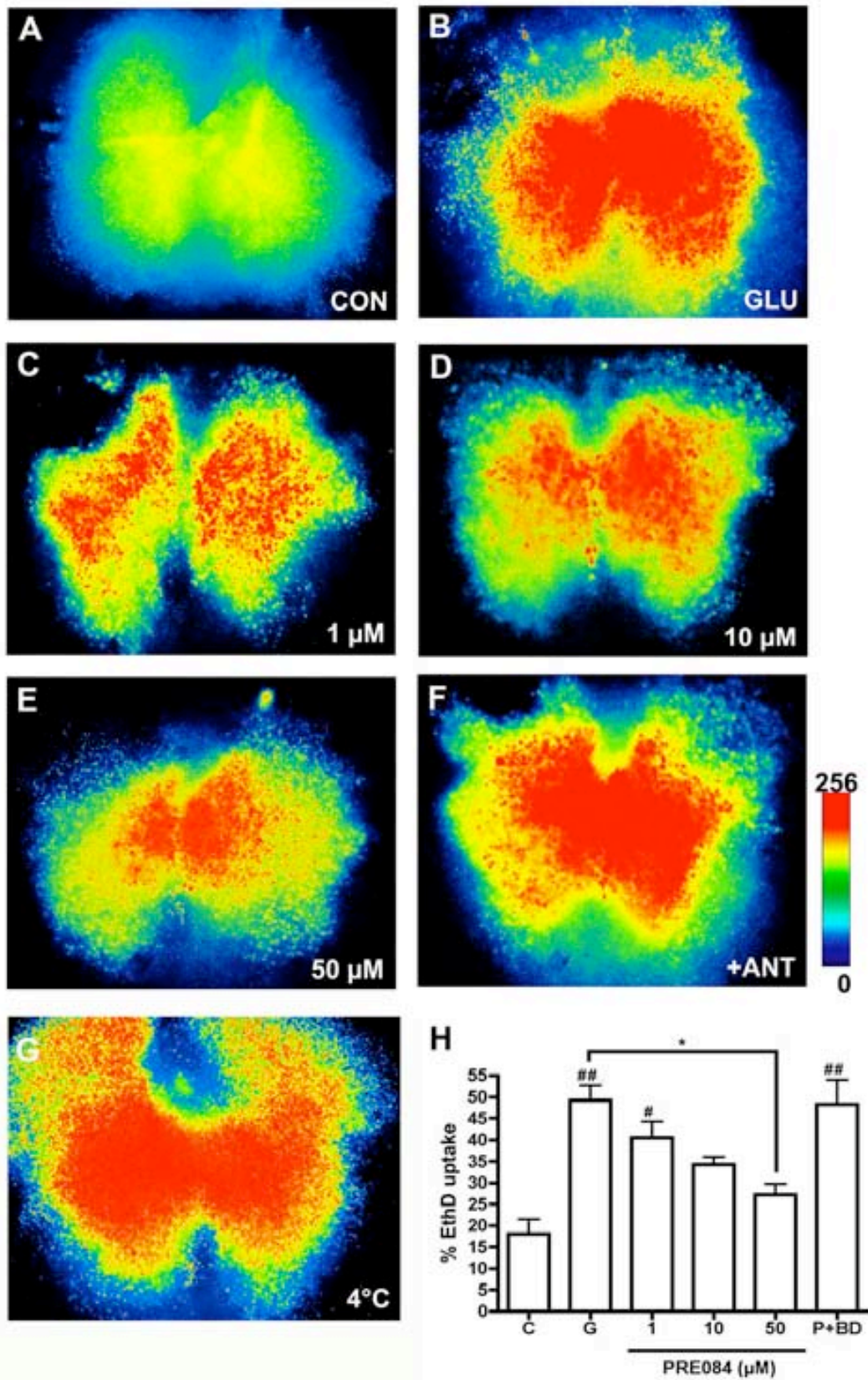


Figure 3

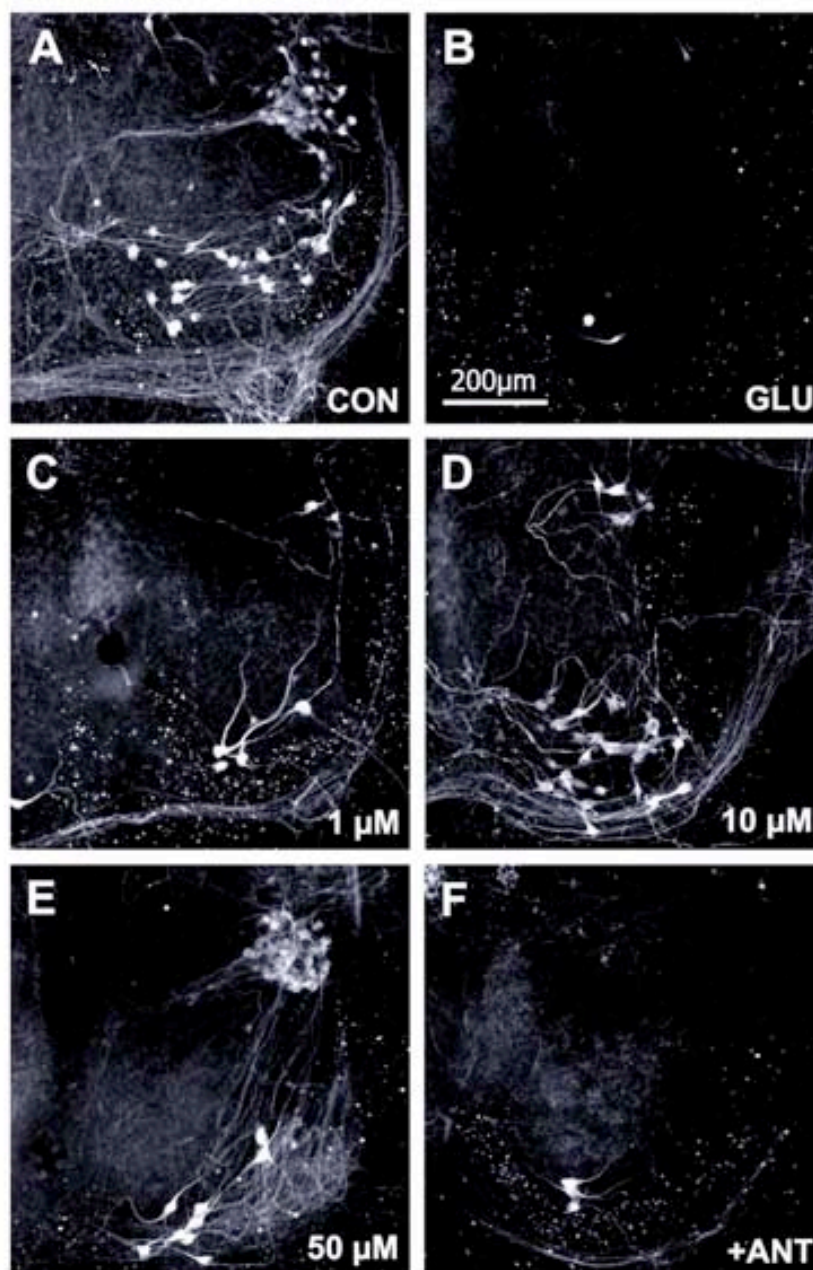


Figure 4

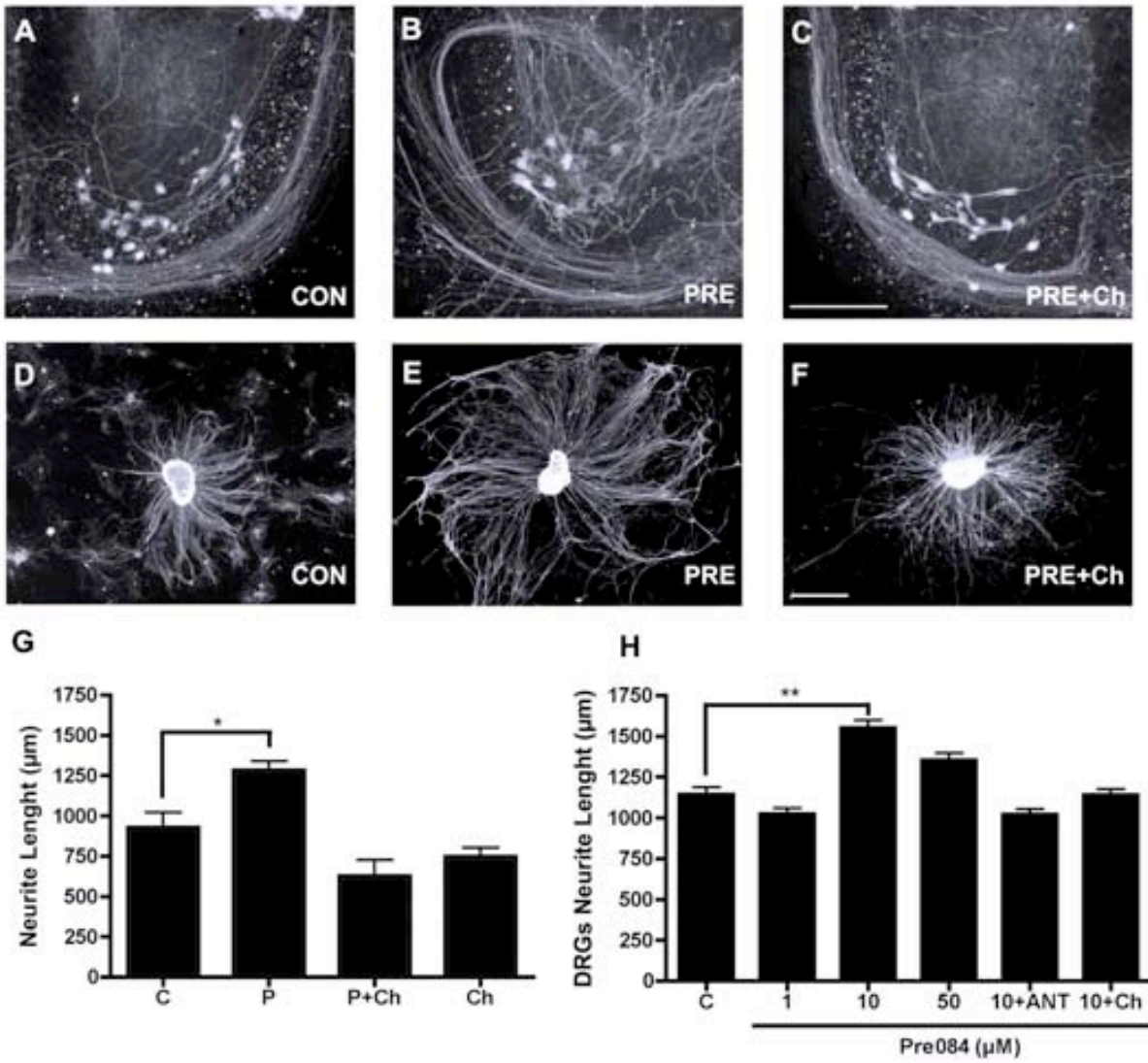
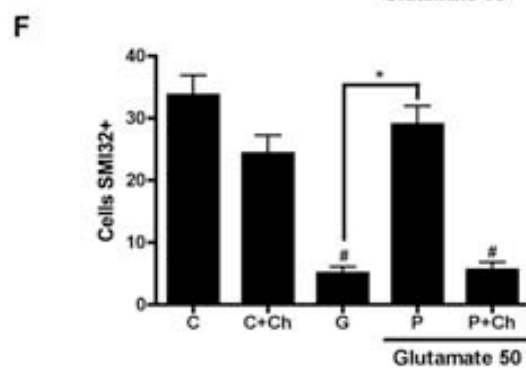
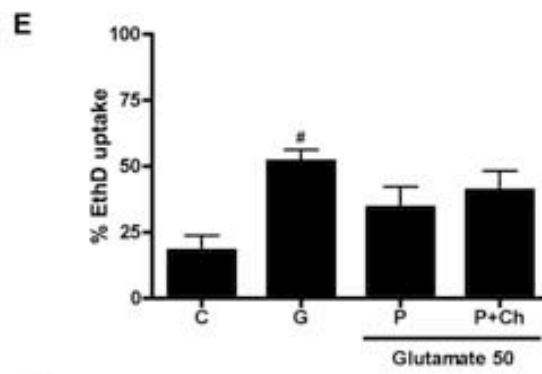
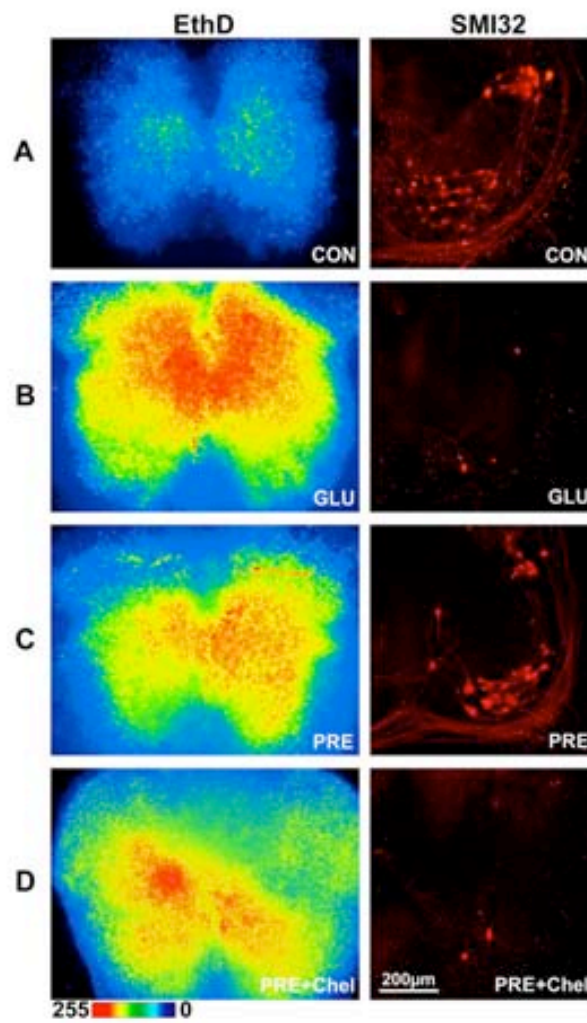


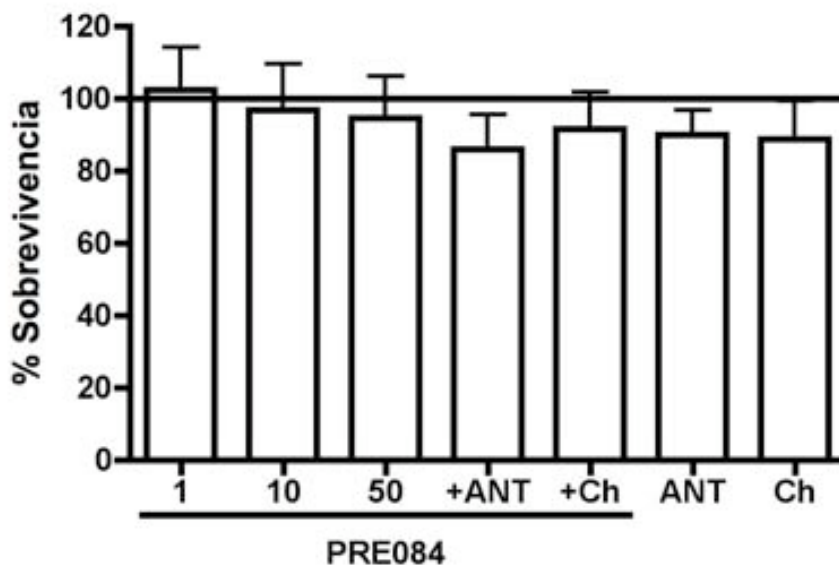
Figure 5



## ANEXO V

### Variación de la viabilidad celular de los cultivos de ganglios de la raíz dorsal tratados con PRE084, BD1063 y *chelerythrine*.

Para el ensayo de elongación de neuritas se hicieron cultivos de neuronas de ganglios de la raíz dorsal, tanto en explantes como disociados. Los explantes fueron utilizados para medir el crecimiento de neuritas y los cultivos de neuronas disociadas, para evaluar el efecto de los fármacos sobre la viabilidad celular. El ensayo con MTT mostró que los cultivos neuronales tratados con el agonista del receptor sigma (PRE084), el antagonista (BD1063) y el inhibidor de PKC (*Chelerythrine*), no tuvieron una disminución significativa en la viabilidad celular con respecto a los cultivos controles (no tratados con fármacos) (Fig 6).



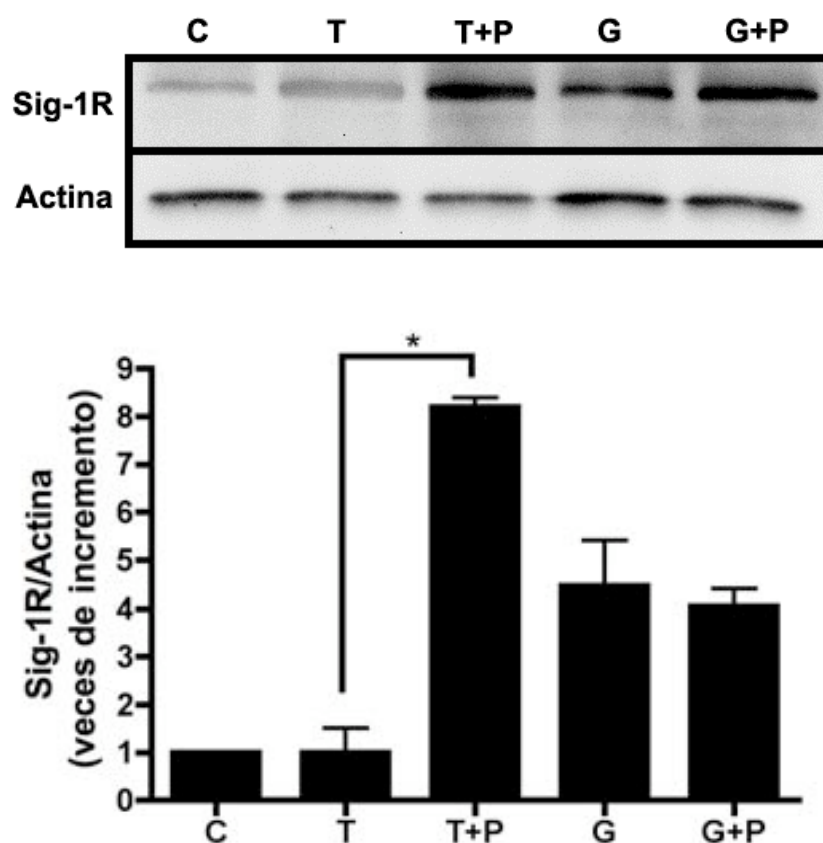
**Figura 6.** Los cultivos disociados de ganglio de la raíz dorsal fueron utilizados para cuantificar, con el ensayo de MTT, la viabilidad de las células tratadas con las diferentes concentraciones de PRE084 (1, 10 y 50  $\mu\text{M}$ ), BD1063 (ANT, 30 $\mu\text{M}$ ) y *chelerythrine* (Ch, 5 $\mu\text{M}$ ). El promedio de las lecturas obtenidas de los cultivos control (no tratados), fue tomado como el 100% de sobrevivencia (línea a la altura del 100%), los demás valores fueron calculados con respecto a éste.



## ANEXO VI

### Cambios en la expresión del receptor sigma-1 en organotípicos de médula espinal

El aumento de los niveles de expresión del receptor sigma-1 en los organotípicos de médula espinal fue cuantificado por *Western blot*. Se observó que el nivel de expresión de la proteína aumentó en los cultivos lesionados con glutamato y en los explantes no lesionados tratados con PRE084 10 $\mu$ M. Este aumento en la expresión del receptor en respuesta a agonistas ha sido descrito en células PC12 y se ha relacionado con un aumento en la generación de neuritas (Hayashi y Su, 2001; Takebayashi et al., 2002).



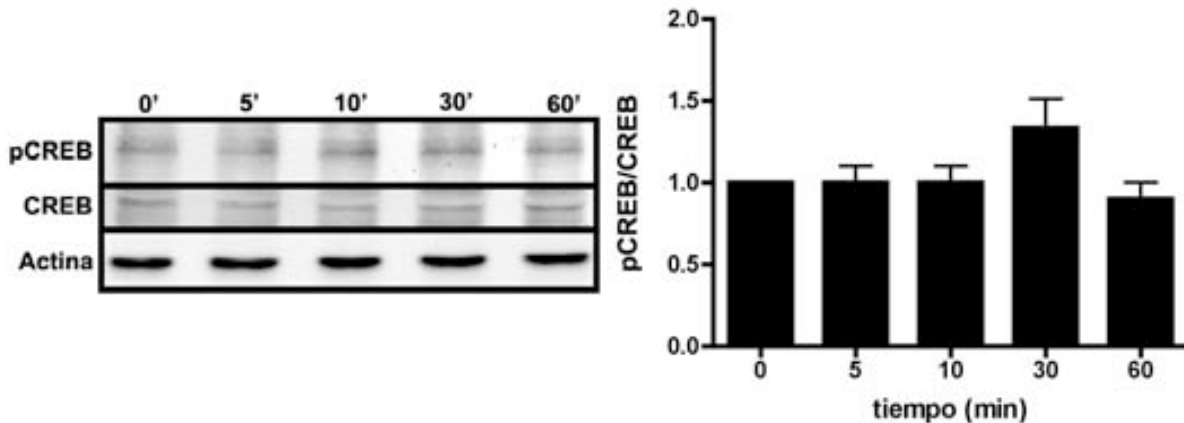
**Figura 7.** El incremento de Sig-1R fue cuantificado por *Western blot*. Sobre el histograma se observa un ejemplo representativo de la inmunodetección. El tratamiento con PRE084, un agonista del receptor sigma, durante 2 días, aumenta los niveles de Sig-1R en los explantes de médula espinal. La lesión excitotóxica con glutamato, también causa un aumento en los niveles del receptor. En el histograma, cada columna representa los valores medios  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,001$ . C, control; G, glutamato; T, controles sometidos a tampón de Locke.

## ANEXO VII

### Los niveles de pCREB en explantes de ganglio de la raíz dorsal, y cultivos organotípicos de médula espinal no varían con el tratamiento de PRE084

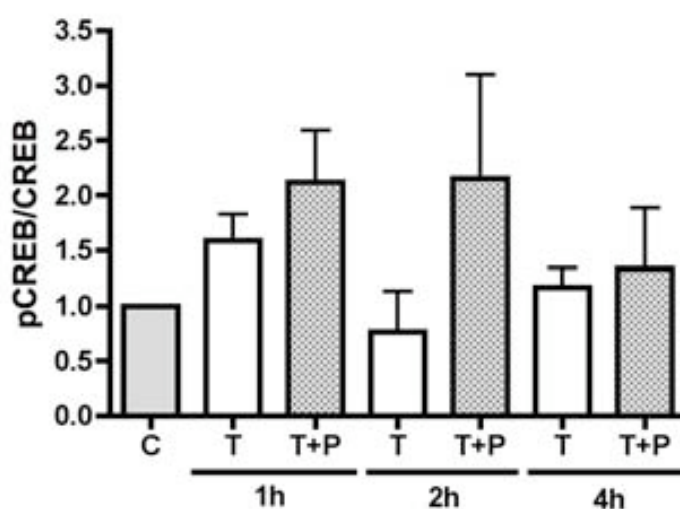
Los cultivos organotípicos y los explantes de DRG tratados con PRE084 fueron recogidos en tampón de lisis con azul de bromofenol al 0,01% (Tris-HCl 62.5 mM pH. 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, DTT 50 mM) y procesados para *Western blot* contra CREB y pCREB, con el objetivo de determinar si CREB se encontraba involucrada en la mediación de los efectos observados con el tratamiento de PRE084.

Los explantes de DRG tratados con PRE084 no mostraron variaciones en los niveles de pCREB en ninguno de los tiempos observados (5, 10, 30 y 60 minutos), aunque hubo un ligero aumento, no significativo, a los 30 minutos de tratamiento con PRE084 (Fig. 8). Este resultado nos está indicando que CREB no está mediando la mejora en la elongación de neuritas observada en los explantes con PRE084.

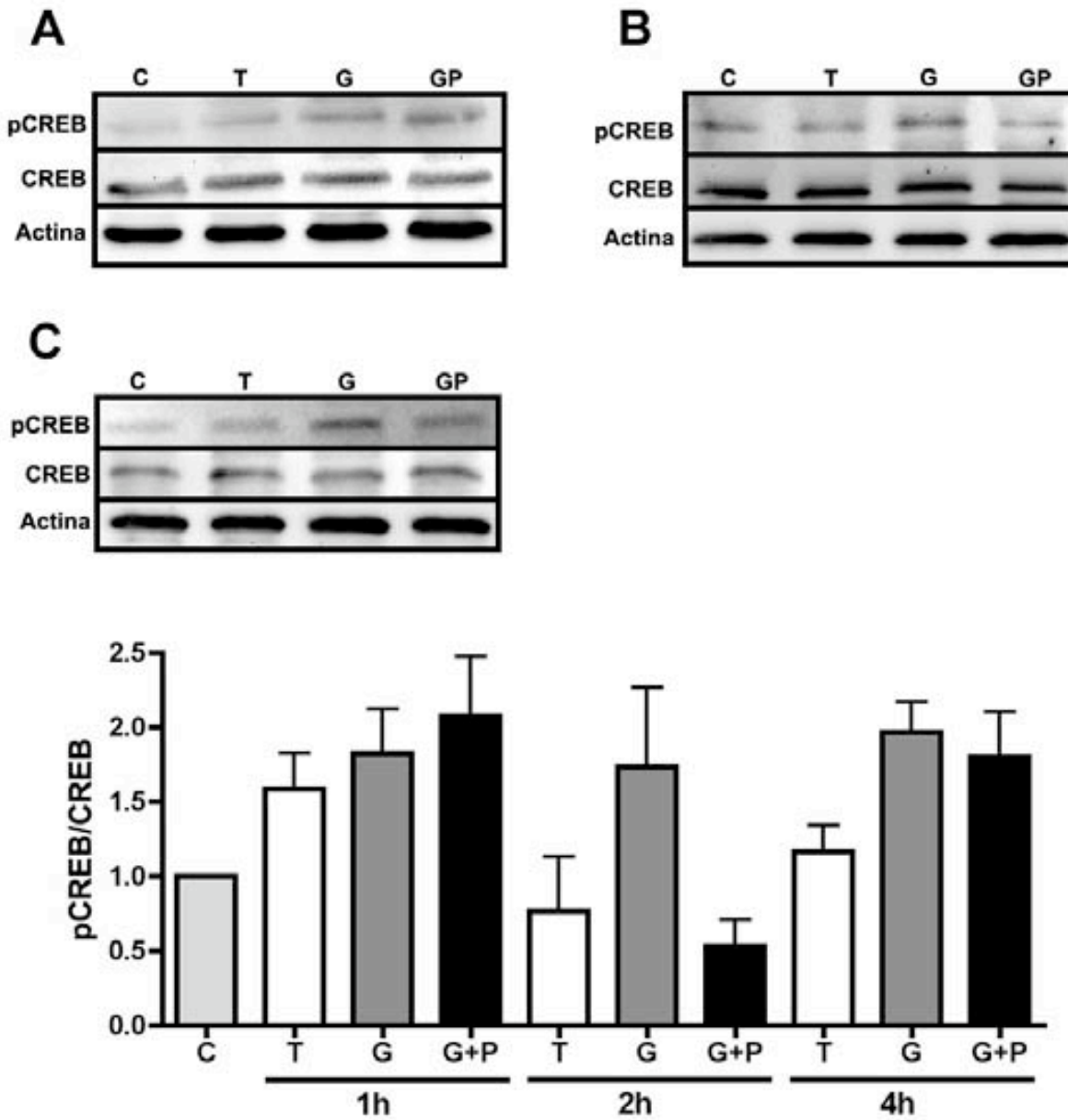


**Figura 8.** Cuantificación de los niveles de pCREB en explantes de DRG tratados con PRE084, mediante *Western blot*. Se observa que no hay variación en los niveles de fosforilación de la proteína a los 5, 10, 30 y 60 minutos después de haber sido tratados con PRE084 10  $\mu$ M. Los valores han sido calculados en función a los controles no tratados (0 min) y están dados en número de veces de incremento con respecto a C. Tanto pCREB como CREB han sido normalizados con respecto a la actina (n = 3- 6 para cada tiempo evaluado).

Los cultivos organotípicos de médula espinal no lesionados y tratados con PRE084 no mostraron cambios significativos en los niveles de pCREB (Fig. 9). De la misma forma, el tratamiento con el agonista del receptor sigma de los organotípicos lesionados con glutamato tampoco mostró variaciones significativas en los niveles de pCREB con respecto al control no lesionado, ni a la lesión después de 1 hora (Fig. 10A), 2 horas (Fig. 10B) y 4 horas (Fig. 10C) de tratamiento (fig. 10, abajo). Estos resultados nos indican que el tratamiento con PRE084 no induce un aumento en la activación de CREB y que los efectos neuroprotectores y de mejora en la elongación de neuritas observados en los explantes, no son ejercidos vía CREB.



**Figura 9.** Histograma de barras enseñando las variaciones en la expresión de pCREB con respecto a CREB en los cultivos organotípicos de médula espinal no lesionados (T) y tratados con PRE084 (T+P), en los tres tiempos evaluados. Cuantificación hecha mediante inmunodetección por *Western blot*. Las barras representan la media  $\pm$  SEM y están indicando el número de veces del aumento con respecto a C. Tanto CREB como pCREB han sido normalizados con respecto a la actina (n = 3-6 para cada tiempo evaluado)



**Figura 10.** Cuantificación mediante *Western blot* de los niveles de pCREB en cultivos organotípicos de médula espinal tratados con PRE084. Membranas representativas de las inmunodetecciones de pCREB, CREB y Actina a 1 hora (A), 2 horas (B) y 4 horas (C) de tratamiento. Abajo, histograma de barras mostrando las variaciones observadas en los niveles de pCREB con respecto a CREB en los diferentes tiempos de evaluación. Las barras representan la media  $\pm$  SEM y están indicando las veces de aumento con respecto a C. Tanto pCREB como CREB han sido normalizados contra actina. C, cultivo control; T, cultivo control sometido a tampón de Locke por 30 minutos; G, cultivo lesionado con glutamato; G+P, cultivo lesionado con glutamato y tratado con PRE084 (n = 3-6 para cada tiempo evaluado).

## **DISCUSIÓN**



El proyecto de investigación que abarca los resultados incluidos en esta memoria se ha centrado en la implementación y caracterización de un modelo de lesión excitotóxica basado en el cultivo organotípico de médula espinal de rata postnatal. El modelo ha permitido realizar un análisis comparativo y evaluación de la capacidad neuroprotectora de diversos fármacos de potencial uso en clínica humana para lesiones traumáticas o procesos neurodegenerativos que afecten la médula espinal. Asimismo, el modelo ha permitido elucidar algunos mecanismos moleculares involucrados, aportando mayor conocimiento para anticipar y predecir sus posibles efectos *in vivo*.

### **Cultivo organotípico de médula espinal**

Los cultivos organotípicos de médula espinal han sido utilizados para estudiar varios aspectos del desarrollo de circuitos neurales (Avossa et al., 2003) y se ha demostrado que este tipo de cultivos mantiene una viabilidad y distribución adecuadas de las distintas clases de neuronas y células gliales (Stavridis et al., 2005). Los cultivos organotípicos son un sistema ideal para el estudio de procesos celulares y moleculares del tejido neural debido a que permiten una buena visualización, fácil acceso en caso de intervención farmacológica, supervivencia celular relativamente prolongada, preservación de la organización neuroanatómica y de las interacciones entre células (Avossa et al., 2003; Bernaudin et al., 1998; Delfs et al., 1989), comparado con los cultivos de células disociadas.

El medio de cultivo empleado para mantener los organotípicos tiene importancia, no sólo porque influye en el grado de supervivencia neuronal sino también para la diferenciación de las acciones de agentes exógenos aplicados al mismo. En este sentido, la presencia de suero en el medio de cultivo, aunque favorece en general la viabilidad de los cultivos celulares, puede interferir con las respuestas celulares o tisulares a diferentes agentes y fármacos administrados al cultivo. En particular, los modelos de neurotoxicidad inducida por glutamato resultan muy sensibles a la presencia de suero en el medio, que aumenta considerablemente las concentraciones de glutamato necesarias para conseguir efectos tóxicos. Medios libres de suero se han utilizado previamente en cultivos organotípicos de médula espinal de origen embrionario de ratones (Baker y Janzen, 1989; Baker et al., 1989), ratas (Lu et al., 2006) y pollos (Rosner y Vacun, 1997), aunque en estos estudios se usaron geles de fibrina y coágulos de plasma para permitir la adhesión del explante, por lo que la posible interferencia de estos substratos en los ensayos no puede descartarse. Otros autores describen la utilización del medio con suero sólo en la fase inicial del cultivo, de

forma que la eliminación del suero del medio sea gradual (Annis et al., 1990; Lu et al., 2006). Esto puede obviarse, ya que se ha demostrado que la omisión del suero no tiene efectos adversos en la supervivencia ni en la morfología de los explantes (Delfs et al., 1989). En este trabajo hemos establecido con éxito el cultivo de explantes de médula espinal de rata postnatal en un medio libre de suero y sobre insertos de membrana para cultivo, las cuales obvian el uso de matrices de anclaje (Stoppini et al., 1991). Hemos demostrado que el cultivo en estas condiciones permite mantener la integridad del tejido neuronal (Evans et al., 1998), ya que preserva las características estructurales de la médula espinal de forma similar a los métodos en que se usa un medio de cultivo con suero. Además, en el cultivo así establecido se mantiene la supervivencia de un número de motoneuronas espinales similar al descrito por otros autores que han usado diferentes medios para cultivos prolongados de explantes de médula espinal de roedor, bien de embriones o de neonatos (Rakowicz et al., 2002; Wetts y Vaughn, 1998).

Los cultivos organotípicos pueden ser preparados a partir de animales embrionarios o postnatales. Estos últimos son adecuados para cultivo ya que la citoarquitectura está establecida en la mayor parte del sistema nervioso central (CNS), evitándose la posible distorsión de la organización del tejido que se observa en los de origen fetal, debido a que en esta etapa la mayoría de las células nerviosas están todavía en fase migratoria (Barber et al., 1993; Gahwiler et al., 1997). Aunque es posible realizar cultivos organotípicos de médula espinal en los que se conserva una buena morfología e integridad estructural *in vitro* a partir de ratones adultos (Krassioukov et al., 2002), no se ha podido obtener resultados similares con ratas adultas, ya que a partir de los 12 días de edad de los animales los cultivos derivados muestran una menor viabilidad neuronal, calidad morfológica y longevidad, comparados con los derivados de P0-P10. Éstas además disminuyen a medida que aumenta la edad de los individuos utilizados para el cultivo (Delfs et al., 1989; Stavridis et al., 2005); por lo cual en este trabajo se realizaron los cultivos a partir de ratas postnatales de 7 días, de forma que no hay dependencia del órgano diana y no hay disminución en la viabilidad del tejido por la edad del animal. Se ha descrito que los cultivos organotípicos de médula espinal continúan su desarrollo y maduran *in vitro*, alcanzando características celulares similares a las observadas en los correspondientes explantes frescos de animales de mayor edad (Avossa et al., 2003; Baker y Janzen, 1989; Baker et al., 1989; Barber et al., 1993; Crain y Peterson, 1963 y 1967; Delfs et al., 1989; Peterson et al., 1965; Phelps et al., 2002; Stoppini et al., 1991). Nosotros hemos demostrado que existen también una maduración bioquímica en las motoneuronas



particularmente al analizar los cambios que se producen en la composición de los receptores de NMDA (ver más adelante). No obstante, existen varias limitaciones reconocidas de los cultivos organotípicos de médula espinal, en particular aquellas relacionadas con el estado axotomizado de las neuronas eferentes espinales de los explantes (Bar, 2000) y, como en cualquier sistema de cultivo, el hecho de que la organización y mecanismos celulares estudiados en cultivos a largo plazo pueden no tener correlato con respuestas *in vivo* (Stoppini et al., 1991).

Un aspecto particularmente relevante de la edad del animal del que se obtiene el cultivo organotípico radica en las variaciones de la respuesta y sensibilidad a agentes externos de las neuronas. Así, las motoneuronas inmaduras son críticamente dependientes, para su normal desarrollo y supervivencia, de moléculas derivadas del músculo diana (Lowry et al., 2001); a P7 esta dependencia del órgano diana se pierde, permitiendo el mantenimiento de cultivos de explantes de médula espinal por periodos de tiempo relativamente largos sin necesidad de añadir factores de crecimiento (Lowry et al., 2001; Rakowicz et al., 2002). Aun así, se observa que hay una disminución en el número de motoneuronas viables entre los 7 y 15 días de cultivo, lo que se puede relacionar con la normal pérdida de neuronas que ocurre durante el periodo postnatal *in vivo* (Baulac y Meininger, 1983; Bennett et al., 1983; Rootman et al., 1981; Scarisbrick et al., 1990).

Se ha publicado que entre el 20% y el 80% de las motoneuronas se pierden en el periodo postnatal, mayoritariamente en los 10 primeros días (Baulac y Meininger, 1983; Bennett et al., 1983; Scarisbrick et al., 1990). Esta pérdida de motoneuronas ha sido atribuida a deficiencias en la técnica de marcaje con HRP (*HorseRadish Peroxidase* –peroxidasa de rábano-), ya que las motoneuronas en ratas neonatas toman y transportan la HRP más eficientemente que las motoneuronas maduras (Nicolopoulos-Stournaras y Iles, 1983), pudiendo afectar las comparaciones realizadas entre individuos de diferentes edades. Además, el hecho de que el tejido conectivo y la cápsula del huso muscular se encuentren poco desarrollados, hace que exista poca resistencia a la difusión de retrotrazadores (Haase, 1990; Rootman et al., 1981), lo que conlleva a un recuento mayor de motoneuronas. Por otro lado, hay que tener en cuenta que durante las tres primeras semanas postnatales se están retirando las terminales axónicas supranumerarias de las placas motoras, las cuales provienen de diferentes motoneuronas (Bennett et al., 1983; Brown, Jansen, y Van Essen, 1976; Dennis et al., 1981). Se ha sugerido que estos axones corresponden a neuronas que están muriendo (Bennett et al., 1983) o, a ramas colaterales que están siendo retiradas por motoneuronas viables (Oppenheim, 1986). También se ha

observado que las motoneuronas tienen ramas colaterales a nivel de la raíz ventral en ratas neonatas (Fraher y O'Sullivan, 1989), y que hay una reducción del número de axones de ésta en la primera semana postnatal (Bennett et al., 1983). Esto puede ser consecuencia de una muerte neuronal (Bennett et al., 1983), o bien de la eliminación de colaterales en la raíz ventral (Bennett et al., 1986). De nuevo, la técnica de marcaje estaría jugando un papel fundamental a la hora de registrar o no errores en el número de motoneuronas, ya que la pérdida de una inervación polineuronal no afectaría los resultados si el marcaje se realiza en el nervio, antes de la ramificación axonal.

En definitiva, en el periodo postnatal se está observando una reducción en el número de motoneuronas ya sea porque efectivamente se está produciendo muerte de motoneuronas, o por pérdida de axones colaterales originados por motoneuronas viables. Aún así no se puede descartar que esto se deba a errores en la difusión del marcador (Lowry et al., 2001). Así mismo, la disminución en el número de motoneuronas observada en los explantes de médula espinal del cultivo puede ser debida, o a un proceso similar al observado *in vivo* durante la etapa postnatal, o a la pérdida de motoneuronas que sucede en todo cultivo a medida que aumenta el tiempo *in vitro* (Delfs et al., 1989), pero el patrón observado en nuestros cultivos no corresponde a las muertes progresivas que han sido registradas anteriormente (Liu et al., 2007; Rakowicz et al., 2002), ni a la muerte por axotomización de las neuronas, que ocurre mayoritariamente a las 24 horas después de la lesión (Stavridis et al., 2005), ni a una muerte por falta de factores tróficos, ya que en ésta el 80% de las motoneuronas muere en los tres primeros días (Rakowicz et al., 2002).

### **Modelos de lesión**

El modelo de lesión por contusión fue previamente descrita, para explantes de hipocampo, por Adamchik y colaboradores (2000) (Adamchik et al., 2000) como un modelo de lesión primaria en el que se simulaba una lesión por impacto como resultado de una contusión craneal. Un modelo de lesión mecánica basado en organotípicos de médula espinal de ratón adulto fue desarrollado por Krassioukov y colaboradores (2002), pero éste es más comparable al descrito como modelo de lesión secundaria por Adamchik et al. (2000) debido a que tiene una pequeña zona de lesión primaria (donde contacta la aguja del impactor), y la zona de propagación de la lesión correspondería al resto del explante. Es así que nuestro modelo de lesión por contusión es un modelo de lesión primaria debido a que la lesión mecánica directa es realizada sobre la totalidad del explante, lo que permitiría la evaluación de la muerte celular por acciones mecánicas y no como único resultado de los

mecanismos secundarios de propagación de la lesión. Sin embargo, a pesar de la idoneidad del método, su reproducibilidad técnica era muy baja debido a la disminución variable del grosor de los explantes tras 15 días de cultivo.

La selección de la lesión excitotóxica por glutamato en el modelo *in vitro* empleado en este trabajo está basada en las numerosas evidencias de que este aminoácido excitador se encuentra involucrado en diferentes formas de daño neuronal, tales como enfermedades neurodegenerativas (Bruijn et al., 2004; Corona et al., 2007; Doble, 1999; Estrada Sanchez et al., 2008; Salinska et al., 2005), lesiones mecánicas y por hipoxia del SNC (Arundine y Tymianski, 2004; Benveniste et al., 1984; Benveniste et al., 1989; Schwartz et al., 2003; Yi y Hazell, 2006). Concretamente, el aumento de los niveles de glutamato se ha descrito en enfermedades que involucran a las motoneuronas espinales, como la ELA, en que la excitotoxicidad se produce por acumulación de glutamato en el espacio extracelular, debido al mal funcionamiento del sistema de transporte de glutamato (Maragakis et al., 2005; Rattray y Bendotti, 2006; Rothstein et al., 1992, 1993 y 1995), o como las lesiones traumáticas de la médula espinal, en las que se observa un incremento en los niveles de glutamato después del traumatismo debido a una excesiva liberación del mismo (Liu et al., 1991; McAdoo et al., 1999; McAdoo et al., 2000; Xu et al., 1998). El incremento en los niveles extracelulares de glutamato conduce a la consiguiente sobreactivación de sus receptores, de tipo AMPA/kainato en lesiones excitotóxicas crónicas (Carriedo et al., 1996; Carriedo et al., 2000; Couratier et al., 1993; Rothstein y Kuncl, 1995; Williams et al., 1997) o de tipo NMDA en lesiones agudas como las lesiones traumáticas de la médula espinal (Meldrum y Garthwaite, 1990; Regan y Choi, 1991; Urushitani et al., 2001). La sobreactivación de estos receptores está asociada a un aumento citosólico de los niveles de  $Ca^{2+}$  llegando a concentraciones tóxicas para la célula, produciendo trastornos en las funciones metabólicas, fosforilación de múltiples proteasas o lipasas y proliferación de especies reactivas de oxígeno (Ankarcrona et al., 1996; Beraudin et al., 1998; Choi, 1987a; Dawson y Dawson, 2004; Kawasaki et al., 1997; Samdani et al., 1997; Wojda et al., 2008).

El nivel basal de glutamato en el tejido medular de la rata oscila entre 15 y 21  $\mu M$  (Choi et al., 1987; McAdoo et al., 1999), siendo diez veces menor en el tejido humano (Liu et al., 1991). Estas concentraciones de glutamato se ven rápidamente aumentadas después de un daño mecánico, hasta alcanzar aumentos superiores al 350% en el sitio de la lesión (Panter et al., 1990). Este pico máximo ocurre entre los 10 y 20 minutos después de haberse producido el traumatismo (Panter et al., 1990) y se mantiene dentro del rango tóxico

durante más de dos horas (Liu et al., 1991). La máxima concentración de glutamato se localiza en el epicentro de la lesión, donde puede superar los 200  $\mu\text{M}$  en roedores (Liu et al., 1991; McAdoo et al., 1999; Xu et al., 1998), y tienden a disminuir en regiones progresivamente alejadas del epicentro de la lesión (McAdoo et al., 1999). En este trabajo con una concentración de glutamato que se encuentra dentro del rango fisiopatológico de la lesión *in vivo*, generamos un daño excitotóxico en el que se pierden el 90% de las motoneuronas y el 60% del tejido medular. Esta concentración es similar a la descrita como nociva para cultivos de neuronas corticales y espinales (Brookes y Burt, 1980; Choi et al., 1987; Choi, 1987b; Durkin et al., 1997; Lipton y Rosenberg, 1994; Yu et al., 2003).

La sensibilidad de las neuronas a la acción tóxica del glutamato se incrementa con la maduración de las mismas (Brookes y Burt, 1980; Didier et al., 1990; Durkin et al., 1997). En cultivos corticales se ha visto que glía y neuronas inmaduras son resistentes a la toxicidad por glutamato (Choi et al., 1987) y que esta resistencia se va perdiendo a medida que las células maduran (Nitecka et al., 1984). El aumento en la sensibilidad al glutamato es debido a las diferencias en la expresión de los receptores de glutamato (Durkin et al., 1997). En el caso de las motoneuronas, es la conformación del receptor NMDA la que determina la particular sensibilidad de éstas a estímulos excitotóxicos. El receptor NMDA es hetero-oligomérico compuesto por una subunidad obligatoria NR1 y una subunidad reguladora NR2 o NR3. La subunidad NR1 confiere las funciones esenciales del receptor NMDA y es expresada de forma ubicua en el SNC (Nishi et al., 2001). Las subunidades reguladoras NR2A-D son moduladas espacial y temporalmente y son encargadas de modificar las propiedades del canal tales como la cinética de las corrientes y la conductancia (Kutsuwada et al., 1996; Meguro et al., 1992; Monyer et al., 1992; Watanabe, Inoue, Sakimura, y Mishina, 1992) mientras que las subunidades NR3A-B regulan la actividad del receptor de forma dominante negativa (Ciabarra et al., 1995; Matsuda et al., 2002; Nishi et al., 2001; Sucher et al., 1995), produciendo una disminución en las corrientes inducidas por NMDA y glutamato (Ciabarra et al., 1995; Das et al., 1998; Matsuda et al., 2002; Nishi et al., 2001) y reduciendo la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (Matsuda et al., 2002; Perez-Otano et al., 2001). Estas subunidades reguladoras, aunque muestran una expresión más limitada, son las responsables de la diversidad funcional del receptor (Nishi et al., 2001).

Durante el periodo embrionario y el periodo postnatal temprano, las motoneuronas expresan la subunidad NR2A, cuya expresión gradualmente decrece hasta el final de la segunda semana postnatal en rata, coincidiendo con el inicio de la expresión de la subunidad NR3B (Fukaya et al., 2005). La expresión de esta subunidad se encuentra

restringida a motoneuronas somáticas en la médula espinal y cerebro adulto, y se incrementa a lo largo del desarrollo postnatal hasta la etapa adulta (Fukaya et al., 2005; Matsuda et al., 2003; Nishi et al., 2001). Se ha observado que de la expresión de esta subunidad depende de la correcta maduración del comportamiento motor (Niemann et al., 2007; Prithviraj y Inglis, 2008). Este fenómeno del cambio de subunidades se ve replicado *in vitro* en el cultivo organotípico descrito en este trabajo, observándose un descenso en la expresión del mRNA de la subunidad NR2A y un aumento en la de NR3B a medida que el cultivo madura. Este resultado sugiere que, a los 15 DIV el estado de madurez de las motoneuronas resulta comparativamente similar al de ratas en edad de destete. Se cree que el aumento de la subunidad NR3B en motoneuronas adultas, puede estar relacionado con la vulnerabilidad al glutamato que se ha observado en estas neuronas, posiblemente por un incremento en la cantidad de receptores NMDA presentes en la membrana citoplasmática, ya que en presencia de NR3B se incrementa la expresión de NR1 en membrana (Matsuda et al., 2003). Además, los niveles de expresión de esta subunidad en la médula espinal parecen estar modificando el curso de la muerte neuronal vía excitotoxicidad por glutamato en algunos trastornos neuronales como en la ELA o en lesiones isquémica espinales (Matsuda et al., 2003), y estar interviniendo en la modulación de la plasticidad sináptica en estados de desarrollo tardíos y en la edad adulta (Matsuda et al., 2003; Prithviraj y Inglis, 2008).

### **Agentes neuroprotectores**

La reducción de la pérdida de sustancia blanca es una efectiva estrategia para disminuir el déficit funcional que resulta de una lesión traumática de médula espinal, pero debe tener en cuenta que este tipo de lesiones también causa la pérdida de la sustancia gris. A esta pérdida de neuronas segmentales se le puede atribuir, parte del daño funcional permanente (Collazos-Castro et al., 2005; Teng et al., 1999). Por consiguiente, la preservación del parénquima medular no sólo es importante para conservar la integridad o la reconexión de las vías ascendentes y descendentes, sino también para asegurar la conservación de las motoneuronas e interneuronas a fin de evitar la pérdida de la inervación de los músculos diana que se origina de los segmentos medulares afectados.

La excitotoxicidad derivada por la anormal transmisión de aminoácidos excitadores en el SNC contribuye a la muerte neuronal en una variedad de desórdenes neurológicos agudos y crónicos. Entre los diferentes tipos neuronales sensibles a la neurotoxicidad inducida por

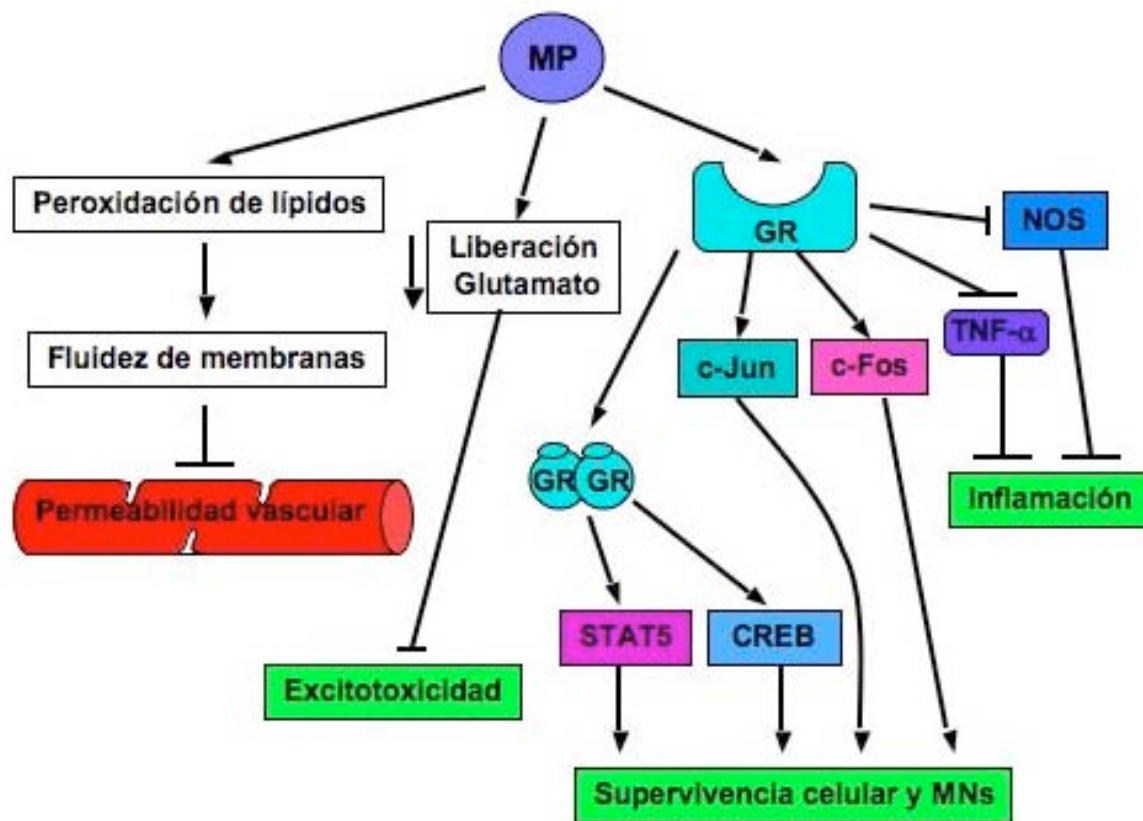
glutamato, las motoneuronas están entre las más vulnerables a insultos excitotóxicos (Estevez et al., 1995).

Con el fin de bloquear el proceso excitotóxico se han desarrollado diversos fármacos neuroprotectores que pueden limitar la extensión del daño tisular secundario y la muerte neuronal (Doble, 1996). El modelo de lesión excitotóxica por glutamato en cultivos organotípicos de médula espinal de rata postnatal permite realizar un ensayo comparativo de estos agentes neuroprotectores. Los ensayos en cultivos organotípicos reducen de forma importante el tiempo de estudio y el número de animales necesarios respecto a los estudios en modelos *in vivo*.

En este trabajo hemos escogido algunos agentes neuroprotectores de particular interés por su demostrada efectividad en una variedad de lesiones que involucran la excitotoxicidad o su prometedor acción neuroprotectora para validar el método propuesto. Hemos evaluado comparativamente la metilprednisolona (MP), el rolipram, el riluzol, el FK506, valproato (VP), y la eritropoyetina (EPO), que se han empleado en estudios clínicos en humanos, el fragmento C de la toxina tetánica y un agonista del Sig1R, el PRE084.

La **metilprednisolona** (MP) es un glucocorticoide sintético extensamente usado como agente farmacológico en lesiones experimentales del sistema nervioso central y como la única opción actual para el tratamiento clínico agudo de las lesiones traumáticas de la médula espinal (Baptiste y Fehlings, 2007). La neuroprotección efectuada por este fármaco en ensayos *in vitro* e *in vivo* se atribuye, en su mayor parte, a la reducción de la peroxidación de lípidos producida por MP (Anderson et al., 1994). Se ha descrito además que la MP reduce la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (Yu et al., 2004) (Fig. 1) y la concentración de eicosanoides en el tejido lesionado (Anderson et al., 1985; Liu y McAdoo, 1993; Saunders et al., 1987), además de disminuir la liberación de glutamato (D. Liu y McAdoo, 1993), reducir la permeabilidad vascular (Xu et al., 1992) e inhibir la expresión de TNF- $\alpha$  y otras citoquinas proinflamatorias (Gorio et al., 2005; Xu et al., 1998b) (Fig. 1). Ensayos utilizando lazaroïdes (análogos de MP que carecen de la actividad glucocorticoide) contra lesiones producidas por glutamato han sido previamente descritos (Kabadere et al., 2004; Monyer et al., 1990; Sureda et al., 1999), al igual que la disminución que ejerce MP en la inhibición del sistema metabolizador de glutamato en lesiones isquémicas de médula espinal en ratas (Wu et al., 2007), pero este ensayo es, hasta donde sabemos, el primero en reportar que la metilprednisolona protege a la médula espinal de una lesión excitotóxica causada por glutamato. La preservación del tejido

observada en nuestro ensayo frente a la excitotoxicidad concuerda con los resultados hallados por Krassioukov y colaboradores (2002), que también observaron protección del tejido después de una lesión mecánica por impacto en explantes de médula espinal tratados con MP.



**Figura 1.** La metilprednisolona (MP) está ejerciendo su efecto neuroprotector principalmente gracias a su efecto antioxidante, evitando la peroxidación de lípidos, conservando así la fluidez de la membrana citoplasmática. La preservación de las membranas de las células endoteliales previene un aumento en la permeabilidad vascular. Por otro lado MP también ejerce parte de su neuroprotección vía receptor de glucocorticoides (GR), este actúa inhibiendo la oxidasa de óxido nítrico (NOS) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), actuando directamente sobre la inflamación, disminuyéndola. El GR también es responsable del aumento de expresión de c-Jun y c-Fos, y los factores de transcripción STAT5 y CREB, relacionados con supervivencia celular. La MP también está disminuyendo la liberación de glutamato evitando la muerte excitotóxica.

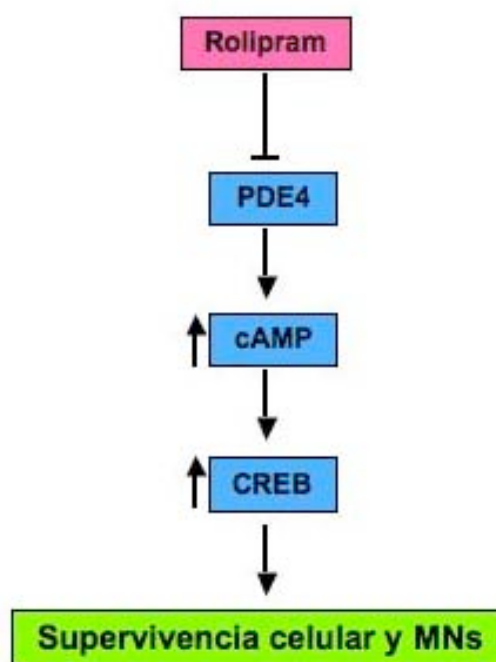
Todos estos efectos contribuyen directamente a la preservación de neuronas y del tejido medular por estabilización y normalización de la función y fluidez de la membrana, reducción de la reactividad glial y preservación de células endoteliales (Taoka et al., 2001). Esta diversidad de efectos puede ser debida a las diferencias de relación dosis-respuesta encontradas en nuestro ensayo, según las cuales la protección tisular es similar en las distintas concentraciones de MP usadas, mientras que la protección de las motoneuronas

presenta un pico de efecto a 0,1  $\mu\text{M}$  de concentración. Para explicar el conjunto de resultados que hemos obtenido con MP (ver Fig. 1) podemos decir que protege el tejido debido a su directa acción como estabilizador de membranas y agente antioxidante, y protege directamente a las neuronas al actuar frenando los procesos inflamatorios e intervenir sobre el metabolismo del glutamato reduciendo la muerte excitotóxica. Sin embargo, a mayores concentraciones de MP, este puede causar una hiper-excitabilidad neuronal debido a que es capaz de reducir la acción inhibitoria de GABA y de aumentar el efecto excitador del glutamato (Foroutan et al., 1996).

El **rolipram**, inicialmente desarrollado como antidepresivo, es un inhibidor de la fosfodiesterasa de tipo IV (PDE4) que ha mostrado efectos positivos en un número de procesos que involucran a la cascada de señalización iniciada por el AMPc provocando mejoría en los procesos de memoria (Bach et al., 1999; Barad et al., 1998; Bourtchouladze et al., 2003), aumento del crecimiento de neuritas y de la regeneración axonal en presencia de inhibidores de mielina, y reducción de la actividad glial (Nikulina et al., 2004). El rolipram también se ha mostrado efectivo en procesos autoinmunes experimentales, tales como la encefalomiелitis alérgica experimental y la esclerosis múltiple (Benveniste, 1997; Block et al., 2001; Sommer et al., 1997).

La fosfodiesterasa hidroliza AMPc a AMP, por lo que su inhibición mejora la señal de CREB-CBP dependiente de AMPc (Beglopoulos y Shen, 2006) (Fig. 2). Entre las fosfodiesterasas, la PDE4 representa el 70-80% de la actividad fosfodiesterasa en el tejido nervioso (Nikulina et al., 2004; Sasaki et al., 2007). PDE4 regula la concentración de AMPc formado por estimulación de los receptores NMDA (Suvarna y O'Donnell, 2002). En el presente trabajo mostramos que la administración de rolipram a 1-10  $\mu\text{M}$  a explantes de médula espinal lesionados con glutamato induce una significativa preservación tisular y un incremento en la viabilidad de las motoneuronas de un 50%. Chen y colaboradores (2007) encontraron valores similares en neuronas corticales tratadas con 1  $\mu\text{M}$  de rolipram antes de inducir el daño con glutamato aunque a diferencia de lo observado por nosotros, obtuvieron un aumento en el grado de protección neuronal al aumentar las concentraciones del fármaco. Nikulina y colaboradores (2004) mostraron en médula espinal, tanto *in vitro* como *in vivo*, que rolipram era efectivo promoviendo la regeneración axonal pero sólo a bajas concentraciones. Los distintos resultados obtenidos en estos estudios pueden ser debidos a las diferencias existentes entre tipos de cultivos y al patrón de tratamiento usado. Finalmente, la necesidad de una mayor concentración de rolipram para inducir la máxima



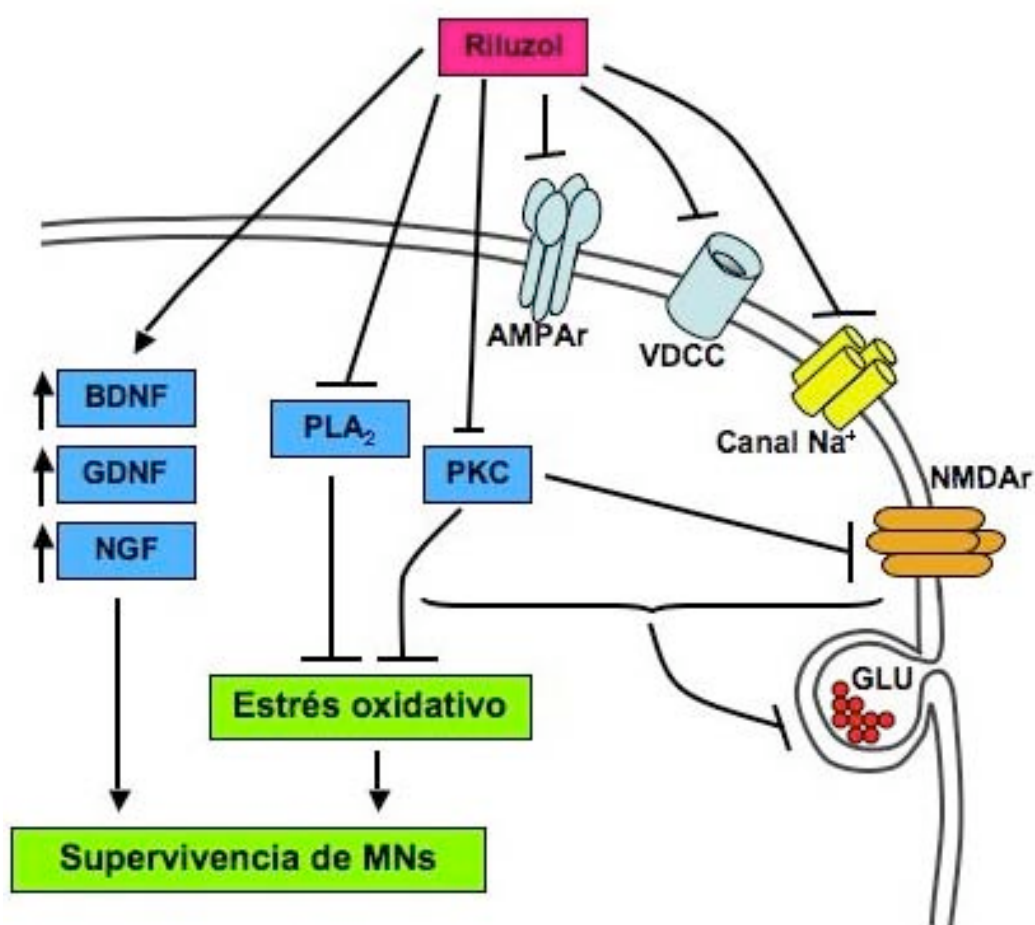


**Figura 2.** El Rolipram actúa inhibiendo a la fosfodiesterasa de tipo IV (PDE4), produciendo un aumento en los niveles de AMP cíclico (AMPC) y la subsiguiente activación del factor de transcripción CREB que se encuentra relacionado con supervivencia neuronal y elongación de neuritas.

protección del parénquima coincide con las observaciones en cultivos de astrocitos y microglía (Zhang et al., 2002) y de oligodendrocitos (Yoshioka et al., 2000) de que las células gliales necesitaban de una alta concentración de rolipram para obtener una respuesta protectora.

**Riluzol** interfiere con la transmisión glutamatérgica a nivel sináptico (Benavides et al., 1985; Cheramy et al., 1992) por un complejo mecanismo de acción que involucra el bloqueo de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje (Hebert et al., 1994), el flujo iónico a través de los canales de NMDA, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y los canales de cloruro sensibles a volumen (Debono et al., 1993; Noh et al., 2000), y posiblemente también interacciona con proteínas G (Doble et al., 1992). De acuerdo con esto, riluzol bloquea la liberación de glutamato (Cheramy et al., 1992) (Fig. 3) y ejerce efectos neuroprotectores en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas agudas o crónicas, incluyendo isquemia (Malgouris et al., 1989; Noh et al., 2000; Pratt et al., 1992). Además de la acción inhibitoria de diversos canales, el riluzol también posee efectos antioxidantes que pueden implicar la inhibición de la proteína quinasa C (PKC) y

fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Noh et al., 2000) e incrementar la expresión de factores neurotróficos como BDNF, GDNF y NGF (Fumagalli et al., 2006; Katoh-Semba et al., 2002) (Fig.3).



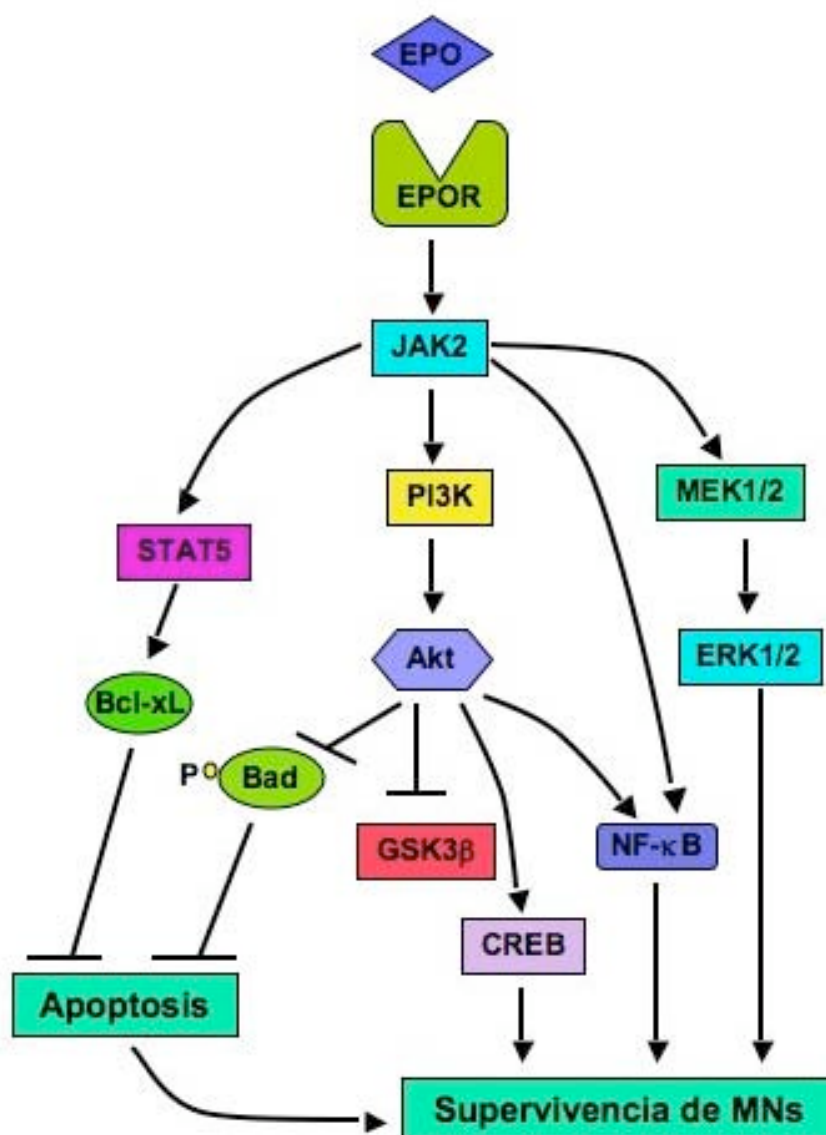
**Figura 3.** El riluzol puede inhibir los canales dependientes de voltaje de sodio (Canal Na<sup>+</sup>) y de Ca<sup>2+</sup> (VDCC), además de modular a los receptores AMPA (AMPAr) y NMDA (NMDAr). La modulación de los receptores NMDA es ejercida vía PKC. Al inhibir PKC se inhibe NMDAr. La inhibición de éstos canales bloquea la liberación de glutamato. Riluzol también inhibe a la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), actuando sobre el proceso inflamatorio e inhibiendo estrés oxidativo. Este fármaco también es responsable de un aumento en los niveles de los factores neurotróficos NGF, BDNF y GDNF.

Los datos actuales muestran que bajas concentraciones de riluzol en explantes de médula espinal lesionados previenen significativamente el daño producido por glutamato a las motoneuronas, lo que concuerda con lo publicado por Estevez y colaboradores (1995). Ellos observaron en cultivos enriquecidos de motoneuronas espinales que concentraciones de riluzol entre 0,1 y 1,0  $\mu$ M prevenían la pérdida de motoneuronas inducida por glutamato y NMDA, pero no la neurotoxicidad producida por AMPA y kainato. También se ha

observado que a concentraciones de riluzol entre 1-10  $\mu\text{M}$  hay un incremento significativo en la capacidad de recaptación de glutamato por los astrocitos (Frizzo et al., 2004). Esto unido a la modulación que ejerce el riluzol en los receptores AMPA/kainato (Doble, 1996; Gilgun-Sherki et al., 2003), que también se encuentra en las células gliales (Yoshioka et al., 1996; Noda et al., 2000; Matute et al., 2001; Brand-Schieber y Werner, 2003; Newcombe et al., 2008), puede ser responsable de los efectos protectores sobre el parénquima medular con 10  $\mu\text{M}$  de riluzol que hemos encontrado en nuestro modelo.

La **eritropoyetina** (EPO), una hormona glicoproteica de 34 kDa, fue caracterizada originalmente como el principal regulador de la eritropoyesis, sin embargo, hay evidencias que indican que tiene también otros efectos. Una de ellas es que tanto EPO como su receptor específico, EPOR, son expresados en diferentes tejidos, incluido el sistema nervioso (Digicaylioglu et al., 1995; Morishita et al., 1997; Nagai et al., 2001). Además, ambas se han encontrado reguladas al alza en cerebros isquémicos (Bernaudin et al., 1999; Sadamoto et al., 1998).

EPO puede prevenir lesiones neuronales tanto *in vivo* como *in vitro* en insultos causados por hipoxia, estrés metabólico y excitotoxicidad en el sistema nervioso (Kontogeorgakos et al., 2008; Montero et al., 2007; Sonmez et al., 2007; Villa et al., 2003; Won et al., 2007; Yoo et al., 2008). En nuestro ensayo se ha observado que el tratamiento con EPO ofrece una protección significativa de las motoneuronas y del parénquima medular que se puede atribuir a los diversos mecanismos de protección que pone en marcha la eritropoyetina. Uno de estos mecanismos es la inhibición de la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  (Villa et al., 2003). Se ha mostrado que TNF- $\alpha$  induce apoptosis en oligodendrocitos después de una lesión de médula espinal (Scurlock y Dawson, 1999) y que IL-6 induce la expresión de la sintasa de óxido nítrico (NO), y una producción excesiva de NO causa disfunción mitocondrial. El NO también puede reaccionar con  $\text{O}_2^-$  dando origen a peroxinitrito (Beckman, et al., 1990), el cual induce muerte celular por apoptosis (Wen et al., 2002). Genc y colaboradores (2006) mostraron que un posible mecanismo de protección de EPO era la disminución del NO producido por la sintasa inducible de NO. Digicaylioglu y Lipton (2001) mostraron que, en efecto, la administración de EPO protegía a las neuronas de la muerte apoptótica relacionada con la producción de NO, pero no afectaba los niveles de éste, lo que sugería que la diferencia en el efecto de EPO sobre la sintasa inducible de NO y la producción del mismo puede ser dependiente y específica del tipo celular (Genc et al., 2006).



**Figura 4.** La eritropoyetina (EPO) actúa mediante su receptor específico, el EPOR, el cual ejerce su acción vía activación de la JAK2, activando las cascadas de respuesta STAT5, PI3k/Akt y MEK/ERK. La activación de estas vías inducen supervivencia celular, por inhibición de la apoptosis, crecimiento y proliferación celular.

El agente EPO también puede ejercer neuroprotección a través del cambio en la relación entre Bcl/Bax produciendo un aumento de la expresión de Bcl-x<sub>L</sub> y promoviendo así un efecto anti-apoptótico (Wen et al., 2002) (Fig. 4). Asimismo, la activación de EPOR previene la apoptosis a través de la activación del factor nuclear κB (NF-κB) por la tirosina quinasa de Janus 2 (Jak2) (Fig.2). A través de esta vía EPO protegería a las neuronas corticales de la apoptosis inducida por NO y excitotoxicidad (Digicaylioglu y Lipton, 2001). Se ha reportado que los efectos antiapoptóticos de NF-κB en neuronas involucran la

activación de Akt-1 y fosforilación de Bad (Fig. 4), además de la regulación al alza de Bcl- $x_L$  (Chong et al., 2003; Chong et al., 2003b; Wen et al., 2002). La activación de Akt-1 puede contribuir a la supervivencia neuronal por estabilización del potencial de membrana mitocondrial, previniendo la liberación del citocromo c (Kennedy et al., 1999). Una vez el citocromo c es liberado de la mitocondria, la entrada en acción de las caspasas asegura la activación de la muerte celular apoptótica (Chong et al., 2002; Chong et al., 2003b) induciendo fragmentación del ADN y la exposición de residuos fosfatidilserina (PS) de la membrana (Chong et al., 2003; Chong et al., 2003b; Lin y Maiese, 2001; Mandal et al., 2002; Mandal et al., 2005). EPO reduce la exposición de estos residuos PS de la membrana y suprime la expresión del receptor PS de la microglía, inhibiendo la activación microglial y evitando la fagocitosis de neuronas (Chong et al., 2003; Chong et al., 2003b; Kang et al., 2003), lo cual mejora la recuperación neurológica (Yatsiv et al., 2005). Al mismo tiempo EPO induce la expresión de BDNF en células neuronales por un incremento de la entrada de  $Ca^{2+}$  por canales dependientes de voltaje y fosforilación del factor CREB (Viviani et al., 2005).

La neuroprotección observada en nuestro ensayo, puede ser debida a un efecto directo de EPO sobre las neuronas, ya que se ha descrito que después de una lesión se produce un aumento en la expresión de EPOR en éstas (Bernaudin et al., 1999; Brines et al., 2000; Digicaylioglu y Lipton, 2001; Grasso et al., 2005), excepto en lesiones con Kainato (KA), en donde la disminuye (Won et al., 2007; Yoo et al., 2008). Además, la adición de EPO refuerza este aumento del receptor (Ghezzi y Brines, 2004), y el aumento de EPOR mediado por EPO parece ser importante en la respuesta regenerativa en MNs (Yoo et al., 2008). La interacción EPO-EPOR rescataría a las neuronas de la muerte apoptótica, lo que a su vez ayuda a atenuar la respuesta inflamatoria de las células gliales (Villa et al., 2003; Yoo et al., 2008). También estaría disminuyendo la respuesta inflamatoria el efecto supresor que ejerce EPO sobre el receptor PS (Chong et al., 2003; Chong et al., 2003b; Kang et al., 2003). Finalmente, para ayudar a reforzar la supervivencia de neuronas, EPO también aumenta la expresión de BDNF (Viviani et al., 2005).

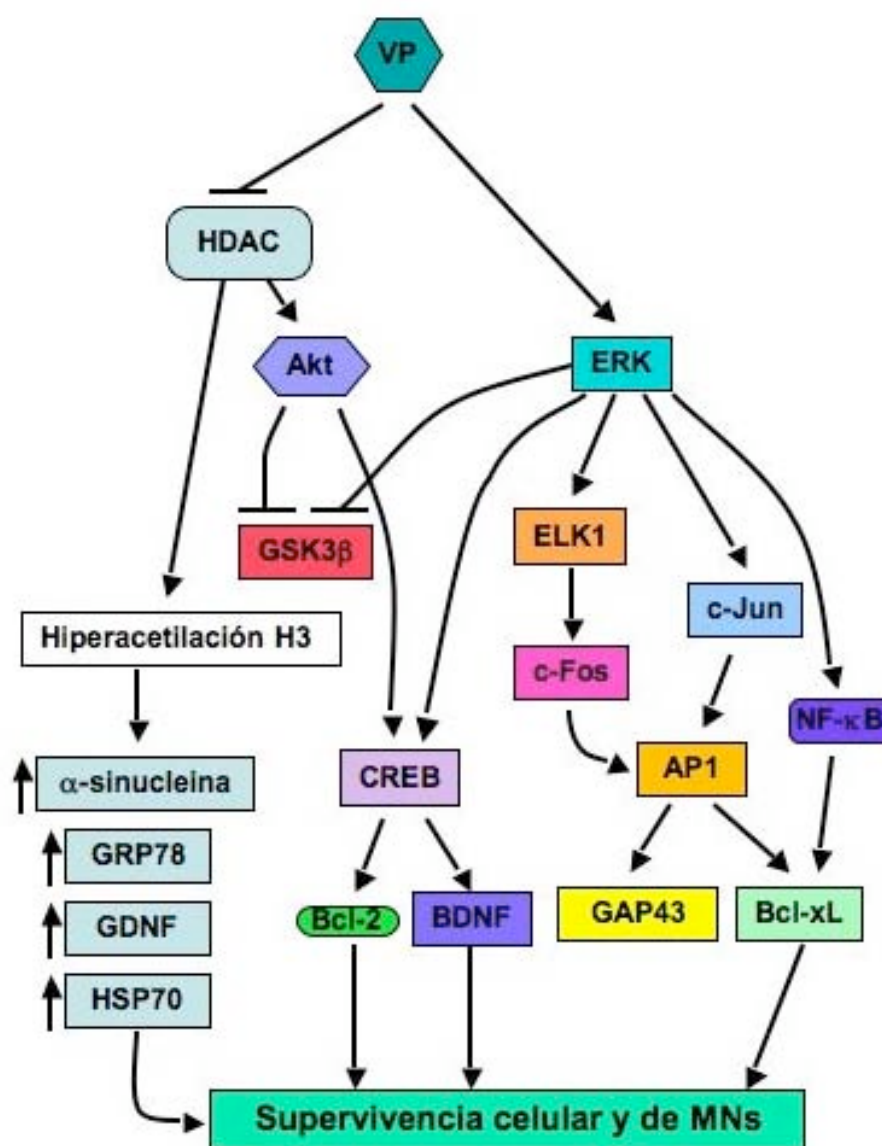
El **valproato** (VP), un ácido graso ramificado de cadena corta, es un fármaco comúnmente usado para el tratamiento clínico del desorden bipolar y la epilepsia. Experimentalmente, en modelos celulares de excitotoxicidad por glutamato, se ha descrito que protege las neuronas corticales y células granulares del cerebelo (Hashimoto et al., 2002a; Kanai et al., 2004); así como en modelos de lesión por privación de oxígeno/glucosa, (Kim et al., 2005)

o de estrés del retículo endoplasmático, evitando la apoptosis a células C6, PC12 (Bown et al., 2002; Hiroi et al., 2005) y neuronas hipocámpales (Kim et al., 2005). La mayoría de estos efectos neuroprotectores observados *in vitro* son obtenidos sólo mediante pretratamiento con VP. En nuestros ensayos el VP fue adicionado a los cultivos organotípicos inmediatamente después de haberse inducido la lesión excitotóxica, produciendo un marcado efecto neuroprotector tanto en preservación del parénquima medular como en aumento de la supervivencia de motoneuronas. Los resultados aquí reportados coinciden con aquellos obtenidos en modelos organotípicos de ELA tratados con VP (Sugai et al., 2004). Además las concentraciones efectivas de tratamiento se encuentran dentro del rango terapéutico (0,3 – 0,6mM) (Williams et al., 2002).

La neuroprotección ejercida por VP se considera que puede ser debida a la activación de factores de supervivencia celular como Akt (De Sarno et al., 2002), ERK (Yuan et al., 2001) y CREB (Einat et al., 2003) (Fig. 5). Además, el VP puede inducir proteínas citoprotectoras como Bcl-2 (Chen et al., 1999), Grp78 (Bown et al., 2002), BDNF (Fukumoto et al., 2001), GDNF (Chen et al., 2006) y Hsp70 (Ren et al., 2004). Por otro lado, VP inhibe la función de la GSK3 $\alpha/\beta$  (Kim et al., 2005) y de la desacetilasa de histonas (HDAC) (Gottlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001) (Fig. 5). La inhibición de la HDAC causa hiperacetilación de histonas. La acetilación o desacetilación de la cola N-terminal de las histonas altera la interacción entre éstas y el DNA de la cromatina remodelándola (Hsieh et al., 2004), siendo este un paso importante en la regulación de la expresión génica (Hsieh y Gage, 2005). En general, la hiperacetilación se encuentra asociada con la activación transcripcional, mientras que la hipoacetilación con la represión. Esta inhibición de la HDAC hiperacetila a la histona 3 (H3) en el promotor de la  $\alpha$ -sinucleína aumentando la actividad del promotor e induciéndola (Leng y Chuang, 2006) y la inducción de la  $\alpha$ -sinucleína por VP ejerce un papel importante en contra de la excitotoxicidad por glutamato (Leng y Chuang, 2006). VP también induce crecimiento de neuritas al incrementar los niveles de GAP-43 gracias a la activación del factor de transcripción AP-1 (Skene, 1989) vía activación de ERK y fosforilación e incremento de c-Jun (Yuan et al., 2001).

Dado que se trata de un fármaco multidiario, resulta difícil poder sugerir cuál es la diana más probable en nuestro modelo para explicar la neuroprotección que observamos. Una explicación posible puede encontrarse en la inhibición de la HDAC que activa CREB y promueve la acetilación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (Quivy y Van Lint, 2004; Ryu et al., 2005; Gerritsen et al., 1997), produciéndose un aumento de los niveles de

GDNF (Feng et al., 2008; Rouaux et al., 2007), BDNF, Bcl-2 y demás genes pro-supervivencia dependientes de CREB (Impey et al., 2004; Li et al., 2008; Rouaux et al., 2007), y de Bcl-xL y otros genes dependientes de NF- $\kappa$ B (Li et al., 2008; Nakano et al., 2006) (Fig. 5).



**Figura 5.** EL efecto neuroprotector del valproato (VP), es ejercido principalmente por la inhibición de la acetilasa de histonas (HDAC), la cual está relacionada con la regulación al alza de la  $\alpha$ -sinucleína, las chaperonas GRP78 y Hsp70, el factor neurotrófico GDNF y el factor de transcripción CREB, este último por medio de la activación de Akt. VP también está activando ERK, aparentemente de una forma no relacionada con la inhibición de la HDAC. La activación de ERK lleva a la activación de c-Fos y c-Jun, las cuales dimerizan para formar el factor de transcripción AP1. ERK también activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

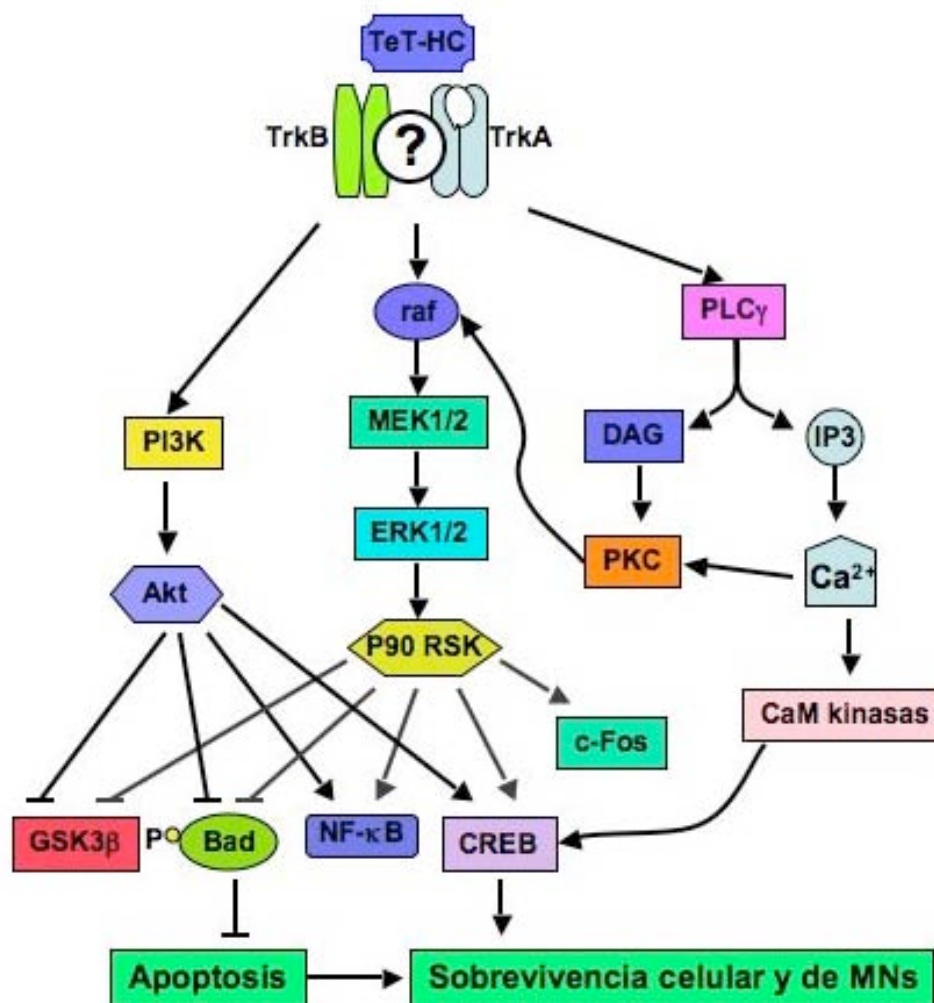
Lo anteriormente descrito podría explicar su efecto neuroprotector sobre las motoneuronas en nuestro modelo organotípico de lesión excitotóxica. Además VP también actúa sobre las células gliales, promoviendo proliferación de astrocitos (Tsai et al., 2008) y el incremento de la expresión de BDNF y GDNF (Chen et al., 2006; Wu et al., 2008), lo que lleva a un efecto neurotrófico y protector indirecto de éstas células hacia las neuronas. Finalmente, se conoce que el VP puede ejercer un efecto pro-apoptótico sobre las células microgliales (Peng et al., 2005; Chen et al., 2007) reduciendo así la respuesta inflamatoria que facilitaría la neuroprotección tal y como sugieren Rossi y colaboradores (2006).

Otro de los agentes analizados en nuestro estudio ha sido la **región C terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica** (TeTx-Hc) que por sus características y sus interacciones moleculares se esperaba que pudiera tener un efecto neuroprotector en los explantes de médula espinal. La TeTx-Hc se ha utilizado principalmente como vehículo de entrega para proteínas exógenas a motoneuronas del SNC (Benn et al., 2005; Larsen et al., 2006) con prometedores resultados, gracias a que TeTx-Hc no es tóxica (Bizzini et al., 1977) y su unión a neuronas es altamente específica (Bordet et al., 2001; Coen et al., 1997; Dobrenis et al., 1992). La TeTx-Hc administrada de forma intramuscular o intravenosa es captada por las motoneuronas espinales en las terminales axonales localizadas en la unión neuromuscular (Bizzini et al., 1977; Fishman y Carrigan, 1988; Weller et al., 1986) y llega a neuronas de orden superior del SNC, gracias al transporte retrógrado y a la transferencia transináptica (Coen et al., 1997).

TeTx interactúa con la membrana a través del fragmento Hc. Esta interacción con la superficie neuronal requiere de un complejo receptor formado por una o más proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinositol (Herreros et al., 2001; Munro et al., 2001) y los polisialogangliosidos GD1b y GT1b (Habermann y Dreyer, 1986; Lalli et al., 2003b), los cuales han sido descritos como activadores de los receptores de neurotrofinas Trk e inductores de la fosforilación de ERK (Duchemin et al., 2002). TeTx-Hc usa los mismos compartimientos de transporte neuronal que el NGF y el receptor de neurotrofinas p75NTR (Deinhardt et al., 2006; Lalli y Schiavo, 2002), además de ser sensible a BDNF y en menor grado a NT-4 (Roux et al., 2006). Varios trabajos (Chaib-Oukadour et al., 2004b; Gil et al., 2000; Gil et al., 2001; Gil et al., 2003) han descrito que TeTx-Hc induce la fosforilación de los receptores Trk y la generación de Diacilglicerol (DAG) vía activación de fosfolipasa C (PLC), con la subsiguiente activación de PKC (Fig. 6). También induce la fosforilación de Raf, MEK1/2, ERK1/2 y p90Rsk, además de la inducción de la vía



PI3K/Akt, la cual se encuentra asociada a la supervivencia celular bajo estrés (J. Yuan y Yankner, 2000).



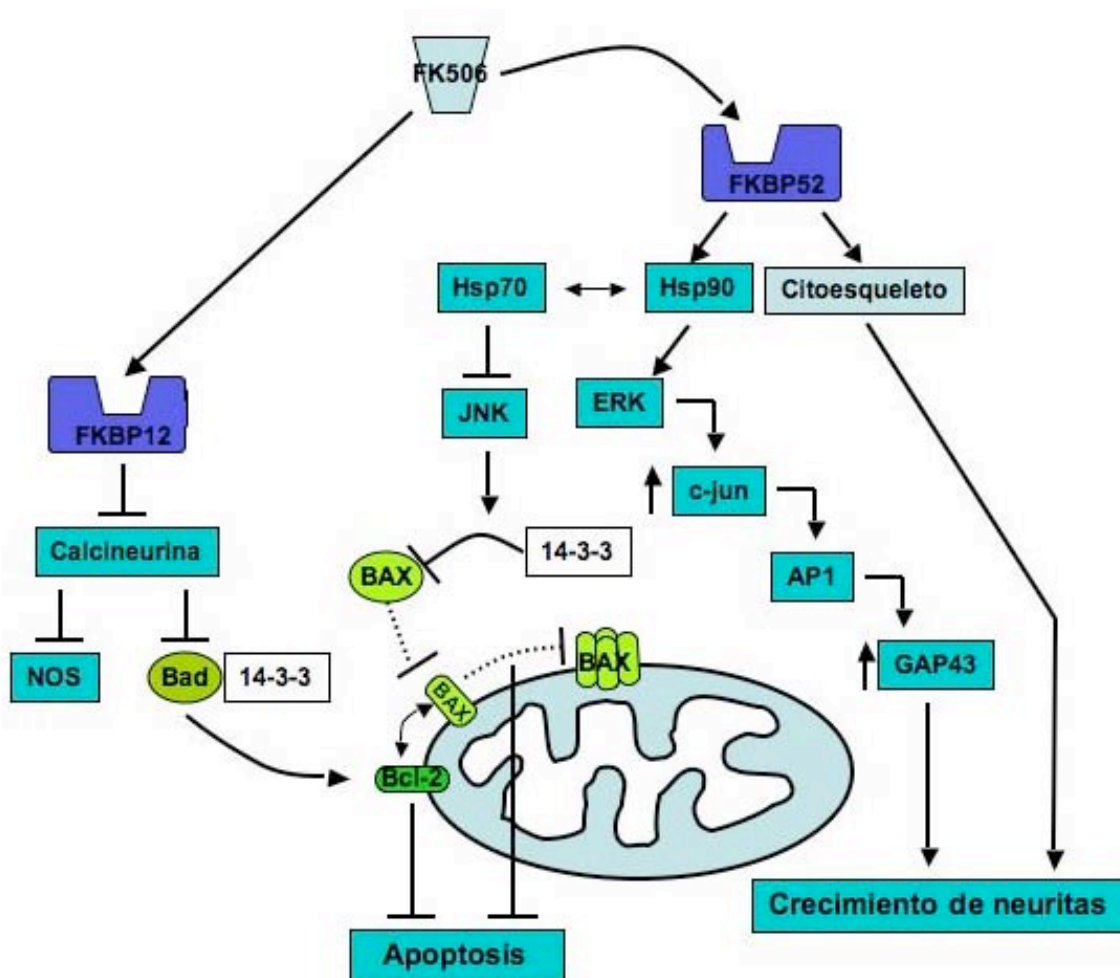
**Figura 6.** La región c terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica (TeTx-Hc) podría estar interactuando de alguna forma con los receptores de neurotrofinas TrkA y TrkB. TeTx-Hc actúa a través de la activación de las cascadas PI3K/Akt, MEK/MAPK y PLC $\gamma$ /PKC, induciendo neuroprotección y posiblemente elongación de neuritas.

Junto a esto se ha publicado un incremento en la fosforilación de CREB y una inhibición en la actividad de caspasa 3. Así, la activación de los receptores Trk por parte de la TeTx-Hc conduce a la activación de al menos tres cascadas de forma paralela, PI3K/Akt, MEK/MAPK y PLC $\gamma$ /PKC, las cuales se ha descrito que son activadas en neuronas tras la adición de neurotrofinas (Kaplan y Miller, 2000).

En nuestro modelo la TeT-Hc está protegiendo a las MNs, tal y como se esperaba por las cascadas que han sido reportadas que activa (Fig. 6) y su aparente interacción con los receptores de neurotrofinas.

En un siguiente trabajo buscamos evaluar los efectos neuroprotectores de **FK506** en el modelo *in vitro* de lesión excitotóxica y elucidar parte de su mecanismo de acción. FK506 o tacrolimus es un potente inmunosupresor que ejerce su actividad mediante la unión a inmunofilinas, llamadas proteínas de unión a FK506 o FKBP (Udina y Navarro, 2002). Además de la función que ejerce sobre el sistema inmune, FK506 también tiene efectos neurotróficos que incluyen la estimulación del crecimiento axonal (Fig. 7) y mejora de la recuperación funcional después de lesiones de nervio periférico y médula espinal (Gold, 1999; Guo et al., 2001; Lopez-Vales et al., 2005; Navarro et al., 2001; Price et al., 2003; Sulaiman et al., 2002; Udina et al., 2004; Voda et al., 2005).

FK506 ejerce su efecto vía unión a FKBP12 y subsecuente inhibición de la calcineurina (Gold et al., 2004; Udina y Navarro, 2002) o por unión a FKBP52, que se une a Hsp90, la cual se une a p23 y al receptor esteroideo para formar el complejo receptor (Gold y Villafranca, 2003b). Es por ésta última vía, la de FKBP52, que FK506 ejerce principalmente su acción neurotrófica (Gold et al., 1999; Gold, 1999; Gold, 2000). El efecto neuroprotector que ejerce FK506 contra la excitotoxicidad por glutamato se ha atribuido a una reducción de la toxicidad mediada por NO, vía inhibición de la calcineurina (Dawson et al., 1993) (Fig. 7), sin embargo no se ha detectado una reducción prominente de los niveles de NO en ensayos *in vivo* (Sasaki et al., 2004). Actualmente se cree que el efecto neuroprotector observado en SNC es en su mayoría ejercido vía FKBP52, que induce Hsp70 (Gold y Villafranca, 2003b; Gold et al., 2004) (Fig. 7). Nuestras observaciones sustentan lo anterior, debido a que el efecto neuroprotector obtenido con FK506 no fue obtenido al usar ciclosporina A, un inhibidor de la calcineurina (ver Artículo 2). En nuestro trabajo observamos que FK506 ejerce un efecto protector del parénquima medular con una relación dosis-respuesta similar a las reportadas anteriormente (Udina et al., 2002; Wang et al., 1997), en las que dosis altas comprometen la viabilidad de neuronas y glía (Zawadzka y Kaminska, 2003). Nuestras observaciones indican que no hay inducción temprana de Hsp70 en motoneuronas y que ésta sólo se produce tras un tratamiento crónico con FK506. Por el contrario, hallamos una prominente activación de Hsp70 en la microglía de los cultivos sometidos a excitotoxicidad y una disminución de esta expresión como respuesta al tratamiento con FK506. La regulación de esta chaperona en la microglía parece ser la responsable del efecto neuroprotector observado en el parénquima medular, ya que Hsp70 regulada al alza y mantenida durante el tiempo con geldanamicina no induce el efecto neuroprotector observado con FK506 (ver Artículo 2).

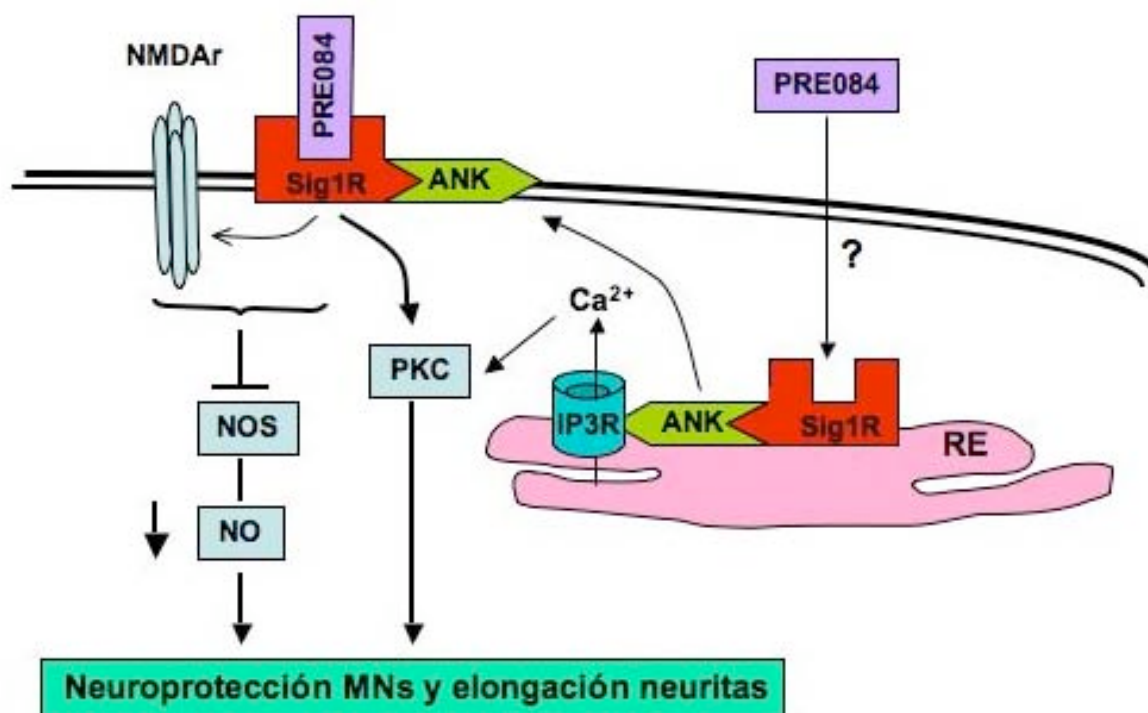


**Figura 7.** FK506 ejerce su efecto neuroprotector posiblemente por la interacción con dos inmunofilinas, la FKBP12 y la FKBP52. La unión de FK506 con FKBP12 induce la inhibición de la calcineurina, la cual inhibe a la sintasa de óxido nítrico y a Bad. Que Bad permanezca fosforilado permite la interacción con la proteína 14-3-3. Ella impide que Bad secuestre a Bcl-2, evitando que Bcl-2 realice su función antiapoptótica. En la membrana mitocondrial externa, Bcl-2 puede unirse a la proteína pro-apoptótica BAX, evitando que ésta forme monopolímeros que producen un poro en la membrana mitocondrial, permitiendo la liberación del citocromo c. FKBP52 interactúa con Hsp90 (FKBP52 hace parte del complejo que soporta y conforma el receptor esteroide, el cual está unido a FKBP52, HSP90 y p23). FK506 al unirse con FKBP52, provoca la activación de Hsp70 por acción de Hsp90. Hsp70 inhibe a la quinasa terminal de c-Jun (JNK), la cual fosforila a 14-3-3 haciendo que se separe de BAX, dejándolo libre. 14-3-3 se une a BAX inhibiéndolo, evitando su traslocación a la membrana mitocondrial externa. Hsp90 también activa al factor de transcripción AP1, vía activación de ERK. AP1 induce la expresión de GAP43, participando en el crecimiento de neuritas. FKBP52 también interactúa directamente con microtúbulos y microfilamentos.

La expresión de esta chaperona en la microglía de los explantes lesionados se debe a que la producción de citoquinas genera una regulación al alza de Hsp70 (Barrow y Dasu, 2005; Fincato et al., 1991) y son estas células las principales productoras de las citoquinas

proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . De esta última se observó un aumento después de la lesión con glutamato y una disminución tras el tratamiento con FK506, resultado que se corresponde con el reportado anteriormente para lesiones de isquemia cerebral, en donde también disminuía la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en animales tratados con FK506 (Zawadzka y Kaminska, 2005).

En el tercer trabajo evaluamos los efectos neuroprotectores de **PRE084**, un agonista específico del receptor sigma 1 (Sig1R) (Su et al., 1991) en el mismo modelo de lesión excitotóxica por glutamato. PRE084 ha sido utilizado previamente en modelos de isquemia y estrés oxidativo en retina (Bucolo y Drago, 2004; Bucolo et al., 2006), isquemia cerebral (Schetz et al., 2007; Shen et al., 2008; Vagnerova et al., 2006) y toxicidad por beta-amiloide (Marrazzo et al., 2005; Meunier et al., 2006), observándose en todos ellos un efecto neuroprotector. Estudios farmacológicos han demostrado la existencia de al menos dos subtipos de receptores sigma, el sigma 1 y el sigma 2 (Quirion et al., 1992). Se ha descrito que Sig1R posee cualidades antiapoptóticas y el Sig2R proapoptóticas (Bucolo et al., 2006). Ambos receptores se encuentran distribuidos diferencialmente en muchas estructuras del SNC, apareciendo concentrados en áreas del tronco encefálico involucradas en funciones motoras, estructuras límbicas, algunas áreas sensoriales y en varias asociadas con funciones endocrinas (Alonso et al., 2000; Gundlach et al., 1986). El Sig1R en la médula espinal se encuentra expresado en la materia gris, especialmente en neuronas de las capas superficiales del asta dorsal y en motoneuronas del asta ventral (Alonso et al., 2000); esta distribución coincide con la que nosotros observamos en los cultivos organotípicos de médula espinal. La neuroprotección ejercida por los ligandos del Sig1R frente a lesiones del SNC y en procesos neurodegenerativos puede deberse a diversas acciones, que incluyen la modulación que ejercen sobre los receptores NMDA (Lobner y Lipton, 1990; Lockhart et al., 1995), atenuación del flujo postsináptico de Ca<sup>2+</sup> evocado por glutamato (DeCoster et al., 1995; Klette et al., 1995) y regulación de las concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (Monnet, 2005), reducción de la producción de NO, mediante la inhibición de la sintasa de NO (Goyagi et al., 2001; Lesage et al., 1995), disminución de la acumulación de glutamato (Shen et al., 2008) y conservación de los niveles de bcl-2 y reducción de la expresión de Bax (Tchedre y Yorio, 2008; Yang et al., 2007) (Fig. 8). Además de la neuroprotección, se ha reportado que agonistas del receptor sigma 1 mejoran el crecimiento de neuritas inducido por factores de crecimiento (Takebayashi et al., 2002)



**Figura 8.** PRE084 es un ligando específico del receptor sigma-1 (Sig1R). Se cree que Sig1R es un receptor intracelular debido a que se encuentra ligado a la proteína de anclaje ankirina (ANK) junto al receptor IP3 (IP3R) del retículo endoplásmico (RE), ayudandola a modularlo. La unión del ligando a Sig1R permite la traslocación del complejo ANK- Sig1R a la membrana plasmática, donde ayuda a modular al receptor NMDA (NMDAr). La acción sobre el NMDAr causa la inhibición de la sintasa de óxido nítrico (NOS), con la subsecuente reducción en los niveles de NO que ayudan a la supervivencia celular al igual que la activación de la PKC.

(Fig. 8), por lo que se cree que las remodelaciones estructurales, como crecimiento de neuritas y cambios en las espinas dendríticas, que se observan con fármacos antidepresivos pueden estar siendo modulados vía Sig1R (Takebayashi et al., 2002; Takebayashi et al., 2004). Además, este crecimiento de neuritas ha sido relacionado con el incremento en la expresión del receptor sigma 1 (Hayashi y Su, 2001; Takebayashi et al., 2002), el cual también hemos observado en nuestros cultivos. Sin embargo, Takebayashi y colaboradores (2002) sugirieron que el efecto neuritogénico de los ligandos de Sig1R actuaban en coordinación con la adición de NGF en el cultivo de células PC12, incrementando los niveles del receptor NGF, y no pudieron observar los efectos de los ligandos sigma *per se*. Nuestros resultados demuestran que el PRE084, agonista de Sig1R, promueve una mayor elongación de neuritas fuera de ejercer un efecto neuroprotector sobre las motoneuronas (ver Artículo 3). Además, hemos descubierto que si bien ambos efectos están mediados por PKC, no parecen estar producidos por un subsiguiente aumento

en la fosforilación de CREB que previamente se ha involucrado en el crecimiento de neuritas (Cheng et al., 2002; Das et al., 2004). La relación Sig1R con PKC había sido previamente sugerida (Morin-Surun et al., 1999; Novakova et al., 1998) y relacionada con procesos como la liberación de dopamina mediada por NMDA (Nuwayhid y Werling, 2003) y la potenciación de flujos de  $Ca^{2+}$  (Monnet et al., 2003).

En los ensayos realizados en este trabajo, la mayoría de los agentes probados atenuaron en mayor o menor grado la pérdida de motoneuronas y de parénquima medular ante la lesión excitotóxica de explantes de médula espinal. En la Tabla 2 se resume el grado de neuroprotección de forma comparativa para los diversos fármacos ensayados, destacando que riluzol y PRE084 son los que muestran un mayor efecto neuroprotector general. Para la translación a estudios *in vivo*, cabe sin embargo, tener en cuenta también los posibles efectos secundarios que estos fármacos pueden tener, así como la relación dosis-efecto.

Para estudios *in vivo* VP, riluzol y PRE084 resultan interesantes debido a los altos niveles de protección de MNs y parénquima medular obtenidos con ellos. Riluzol y VP son actualmente utilizados en pacientes con ELA, siendo el riluzol el único que incrementa la supervivencia de estos pacientes. Se ha observado en evaluaciones preclínicas que un tratamiento prolongado con riluzol disminuye la viabilidad en células no lesionadas (Estevez et al., 1995). Por el contrario, la administración de VP no reduce significativamente la viabilidad, pero en ensayos *in vivo* es capaz de disminuir la temperatura corporal (Unalp et al., 2008). PRE084, como algunos de los fármacos antidepresivos disponibles en el mercado, actúa vía Sig1R y la activación de estos receptores en la médula espinal ha sido relacionada con la facilitación de la transmisión del dolor, mejorando la respuesta nociceptiva (Kim et al., 2008). Otro fármaco que resulta atractivo para usar en ensayos *in vivo* es la TeTx-Hc en combinación con algún fármaco que aumente la expresión de BDNF, como EPO, VP y riluzol, ya que BDNF facilita la acción de TeTx-Hc (Roux et al., 2006). Además, con estas combinaciones también se induciría protección del parénquima medular, ya que EPO incrementa el número de precursores de oligodendrocitos (Vitellaro-Zuccarello et al., 2007; Zhang et al., 2005) y promueve la la formación de sus procesos (Sugawa et al., 2002), contribuyendo a la restauración de la densidad de la mielina; pero EPO no hace más permisivo al crecimiento axonal el microambiente de la zona de la lesión (Viterallo-Zuccarello et al., 2007), además de la restringida ventana de acción (Bines et al., 2000; Cherian et al., 2007) (Ver Artículo 1).

**Tabla 2.** Porcentaje de conservación del tejido y de motoneuronas en los explantes de médula espinal con cada uno de los agentes neuroprotectores ensayados en el modelo de lesión excitotóxica.

	Concentración	% MN viables	% Tejido Preservado	Promedio
PRE084 ( $\mu$ M)	1	24,2	72,6	48,4
	10	88,5	80,2	84,4
	50	52,7	88,7	70,7
RIL ( $\mu$ M)	0,1	65,2	30,4	47,8
	1	85,4	90,6	88,0
	10	74,8	100,0	87,4
	100	45,1	78,3	61,7
VP (mM)	0,01	33,8	68,7	51,3
	0,06	88,8	73,7	81,3
	0,6	84,6	85,3	85,0
EPO (U/ml)	0,15	31,0	71,0	51,0
	0,75	50,8	60,1	55,5
	1,5	71,8	72,8	72,3
	7,5	77,9	60,9	69,4
MP ( $\mu$ M)	0,01	37,4	73,9	55,7
	0,1	92,1	78,1	85,1
	1	74,6	71,8	73,2
	10	69,5	67,4	68,5
	100	43,2	73,1	58,2
ROL ( $\mu$ M)	0,1	36,1	40,0	38,1
	1	50,0	75,0	62,5
	10	45,1	84,4	64,8
	100	31,8	22,1	27,0
FK506 (nM)	50	11,8	67,5	39,7
	100	13,2	80,7	47,0
TeTx-Hc (nM)	0,1	33,7		
	1	71,1		
	10	62,6		
	100	42,2		

En busca de la regeneración axonal en lesiones medulares, tal vez el uso de rolipram para sobreponerse a las señales de inhibición del crecimiento (Chen et al., 2007; Sasaki et al., 2007; Hannila y Filbin, 2008), junto con un fármaco que favorezca la elongación de neuritas como PRE084, podría ser buena estrategia, aunque rolipram puede causar inmunosupresión (Nikulina et al., 2004).



## **CONCLUSIONES**



- El cultivo organotípico de médula espinal de rata postnatal (P7-8) en medio neurobasal sin suero permite la supervivencia de motoneuronas y de células gliales, y la preservación tisular de forma similar al cultivo en medio estándar con suero; sin embargo, a los 10 DIV de cultivo el número de motoneuronas sobrevivientes resulta mayor en el medio sin suero.
- Los cultivos organotípicos de médula espinal presentan un aumento de la subunidad NR3B del receptor NMDA similar a la que se produce *in vivo* entre P7 y P22 en las motoneuronas.
- La adición de glutamato 50  $\mu$ M en el medio de los cultivos organotípicos de médula espinal es suficiente para producir una lesión de tipo excitotóxico en los explantes. Esta lesión es mediada principalmente por los receptores NMDA y parcialmente por los receptores AMPA, observándose una pérdida superior al 90% de las motoneuronas y del 50% en el parénquima medular.
- Se ha desarrollado un modelo de lesión mecánica basado en un cultivo organotípico de médula espinal de rata postnatal (P7-8) que podría modelar la lesión traumática primaria, aunque presenta una baja reproducibilidad.
- El modelo *in vitro* de lesión excitotóxica en médula espinal de rata permite la evaluación rápida del potencial neuroprotector de diferentes fármacos, evaluado mediante la incorporación de EthD, como indicador del daño celular del parénquima, y el inmunomarcaje de SMI32, como marcador selectivo de motoneuronas.
- Del análisis comparativo efectuado, se concluye que metílprednisolona, valproato, PRE084 y riluzol, y en menor medida EPO y rolipram, pero no FK506, protegen las motoneuronas, mientras que riluzol, PRE084, valproato, rolipram y FK506, y en menor medida EPO y metílprenisolona, protegen al parénquima medular en el modelo de lesión excitotóxica por glutamato.

- El modelo *in vitro* desarrollado permite la investigación de mecanismos de interacción celular y molecular implicados en la neurodegeneración y la neuroregeneración.
- FK506 modula la expresión de Hsp70 en células microgliales, causando una atenuación transitoria de la chaperona inducida tras la lesión excitotóxica. Esta modulación es relevante para la protección que ejerce el fármaco en el parénquima medular en el modelo *in vitro* de lesión excitotóxica. Además, nuestros datos apuntan a que la unión a FKBP52 es necesaria para los efectos neuroprotectores del FK506.
- El modelo de lesión excitotóxica sirve como sistema de evaluación previa a la experimentación preclínica *in vivo* de nuevos fármacos.
- El agonista selectivo del receptor sigma 1, PRE084, protege a las motoneuronas y el parénquima medular de una lesión excitotóxica *in vitro* e induce la elongación de neuritas tanto en motoneuronas espinales como en neuronas del ganglio de la raíz dorsal. La activación de PKC es necesaria para los efectos de neuroprotección y elongación de neuritas ejercidos por PRE084, efectos que no son mediados por el factor de transcripción CREB. El receptor sigma 1 se encuentra distribuido en los cultivos de médula espinal de forma similar a la descrita *in vivo* en la médula espinal.
- La región c terminal de la cadena pesada de la toxina tetánica protege al 71% de las motoneuronas de una lesión excitotóxica en los explantes de médula espinal de rata postnatal lesionados con glutamato.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Abdel-Hamid, K. M., y Tymianski, M. (1997). Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins. *Journal of Neuroscience*, 17(10), 3538-3553.
- Abood, M. E., Rizvi, G., Sallapudi, N., y McAllister, S. D. (2001). Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neuroscience Letters*, 309(3), 197-201.
- Adamchik, Y., Frantseva, M. V., Weisspapir, M., Carlen, P. L., y Perez Velazquez, J. L. (2000). Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research Protocols*, 5(2), 153-158.
- Agrawal, S. K., y Fehlings, M. G. (1996). Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: Role of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, the  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger, and the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Neuroscience*, 16(2), 545-552.
- Agrawal, S. K., y Fehlings, M. G. (1997). The effect of the sodium channel blocker QX-314 on recovery after acute spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 14(2), 81-88.
- Almeida, S., Domingues, A., Rodrigues, L., Oliveira, C. R., y Rego, A. C. (2004). FK506 prevents mitochondrial-dependent apoptotic cell death induced by 3-nitropropionic acid in rat primary cortical cultures. *Neurobiology of Disease*, 17(3), 435-444.
- Alonso, G., Phan, V., Guillemain, I., Saunier, M., Legrand, A., Anoa, M., et al. (2000). Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, 97(1), 155-170.
- Anderson, D. K., Dugan, L. L., Means, E. D., y Horrocks, L. A. (1994). Methylprednisolone and membrane properties of primary cultures of mouse spinal cord. *Brain Research*, 637(1-2), 119-125.
- Anderson, D. K., Saunders, R. D., Demediuk, P., Dugan, L. L., Braughler, J. M., Hall, E. D., et al. (1985). Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: Partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Central Nervous System Trauma*, 2(4), 257-267.
- Andersson, O., Stenqvist, A., Attersand, A., y von Euler, G. (2001). Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics*, 78(3), 178-184.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Orrenius, S., y Nicotera, P. (1996). Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Letters*, 394(3), 321-324.

- Annis, C. M., Edmond, J., y Robertson, R. T. (1990). A chemically-defined medium for organotypic slice cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 32(1), 63-70.
- Antkiewicz-Michaluk, L., Lazarewicz, J. W., Patsenka, A., Kajta, M., Zieminska, E., Salinska, E., et al. (2006). The mechanism of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines neuroprotection: The importance of free radicals scavenging properties and inhibition of glutamate-induced excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 97(3), 846-856.
- Arishima, Y., Setoguchi, T., Yamaura, I., Yone, K., y Komiya, S. (2006). Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. *Spine*, 31(21), 2432-2438.
- Arundine, M., y Tymianski, M. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(6), 657-668.
- Ates, O., Cayli, S. R., Gurses, I., Turkoz, Y., Tarim, O., Cakir, C. O., et al. (2007). Comparative neuroprotective effect of sodium channel blockers after experimental spinal cord injury. *Journal of Clinical Neuroscience*, 14(7), 658-665.
- Atlante, A., Gagliardi, S., Minervini, G. M., Ciotti, M. T., Marra, E., y Calissano, P. (1997). Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: A major role for xanthine oxidase in oxygen radical formation. *Journal of Neurochemistry*, 68(5), 2038-2045.
- Avossa, D., Rosato-Siri, M. D., Mazzarol, F., y Ballerini, L. (2003). Spinal circuits formation: A study of developmentally regulated markers in organotypic cultures of embryonic mouse spinal cord. *Neuroscience*, 122(2), 391-405.
- Ayata, C., Ayata, G., Hara, H., Matthews, R. T., Beal, M. F., Ferrante, R. J., et al. (1997). Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice. *Journal of Neuroscience*, 17(18), 6908-6917.
- Azari, M. F., Profyris, C., Karnezis, T., Bernard, C. C., Small, D. H., Cheema, S. S., et al. (2006). Leukemia inhibitory factor arrests oligodendrocyte death and demyelination in spinal cord injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(9), 914-929.
- Bach, M. E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y. F., Shih, R., et al. (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP



- signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96(9), 5280-5285.
- Baker, R. E., Guerold, B., y Dreyfus, H. (1989). Gangliosides of the mouse spinal cord: A comparison in in vivo and in vitro tissues. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 7(1), 93-101.
- Baker, R. E., y Janzen, D. G. (1989). Non-selective afferent innervation develops in embryonic mouse spinal cord-dorsal root ganglia explants chronically exposed to GM1 ganglioside. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 7(1), 87-92.
- Balentine, J. D. (1978a). Pathology of experimental spinal cord trauma. I. the necrotic lesion as a function of vascular injury. *Laboratory Investigation*, 39(3), 236-253.
- Balentine, J. D. (1978b). Pathology of experimental spinal cord trauma. II. ultrastructure of axons and myelin. *Laboratory Investigation*, 39(3), 254-266.
- Balentine, J. D., y Spector, M. (1977). Calcification of axons in experimental spinal cord trauma. *Annals of Neurology*, 2(6), 520-523.
- Banik, N. L., Matzelle, D. C., Gantt-Wilford, G., Osborne, A., y Hogan, E. L. (1997). Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury. *Brain Research*, 752(1-2), 301-306.
- Banik, N. L., Shields, D. C., Ray, S., Davis, B., Matzelle, D., Wilford, G., et al. (1998). Role of calpain in spinal cord injury: Effects of calpain and free radical inhibitors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 844, 131-137.
- Baptiste, D. C., y Fehlings, M. G. (2006). Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, 23(3-4), 318-334.
- Baptiste, D. C., y Fehlings, M. G. (2007). Update on the treatment of spinal cord injury. *Progress in Brain Research*, 161, 217-233.
- Bar, P. R. (2000). Motor neuron disease in vitro: The use of cultured motor neurons to study amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 405(1-3), 285-295.
- Barad, M., Bourtchouladze, R., Winder, D. G., Golan, H., y Kandel, E. (1998). Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95(25), 15020-15025.

- Barbeito, L. H., Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Peluffo, H., Viera, L., et al. (2004). A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research Reviews*, 47(1-3), 263-274.
- Barber, R. P., Phelps, P. E., y Vaughn, J. E. (1993). Preganglionic autonomic motor neurons display normal translocation patterns in slice cultures of embryonic rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 13(11), 4898-4907.
- Bareyre, F. M., y Schwab, M. E. (2003). Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: Insights from DNA microarrays. *Trends in Neurosciences*, 26(10), 555-563.
- Bargmann, C. I. (1991). Death from natural and unnatural causes. *Current Biology*, 1(6), 388-390.
- Barrow, R. E., y Dasu, M. R. (2005). Oxidative and heat stress gene changes in hypertrophic scar fibroblasts stimulated with interleukin-1beta. *Journal of Surgical Research*, 126(1), 59-65.
- Basu, S., Hellberg, A., Ulus, A. T., Westman, J., y Karacagil, S. (2001). Biomarkers of free radical injury during spinal cord ischemia. *FEBS Letters*, 508(1), 36-38.
- Baulac, M., y Meininger, V. (1983). Postnatal development and cell death in the sciatic motor nucleus of the mouse. *Experimental Brain Research*, 50(1), 107-116.
- Bavetta, S., Hamlyn, P. J., Burnstock, G., Lieberman, A. R., y Anderson, P. N. (1999). The effects of FK506 on dorsal column axons following spinal cord injury in adult rats: Neuroprotection and local regeneration. *Experimental Neurology*, 158(2), 382-393.
- Beart, P. M., Lim, M. L., Chen, B., Diwakarla, S., Mercer, L. D., Cheung, N. S., et al. (2007). Hierarchical recruitment by AMPA but not staurosporine of pro-apoptotic mitochondrial signaling in cultured cortical neurons: Evidence for caspase-dependent/independent cross-talk. *Journal of Neurochemistry*, 103(6), 2408-2427.
- Beattie, M. S., Farooqui, A. A., y Bresnahan, J. C. (2000). Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 17(10), 915-925.
- Beattie, M. S., Hermann, G. E., Rogers, R. C., y Bresnahan, J. C. (2002). Cell death in models of spinal cord injury. *Progress in Brain Research*, 137, 37-47.
- Becker, D. B., Jensen, J. N., Myckatyn, T. M., Doolabh, V. B., Hunter, D. A., y Mackinnon, S. E. (2000). Effects of FKBP-12 ligands following tibial nerve injury in rats. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 16(8), 613-620.

- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., y Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87(4), 1620-1624.
- Beglopoulos, V., y Shen, J. (2006). Regulation of CRE-dependent transcription by presenilins: Prospects for therapy of alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(1), 33-40.
- Benavides, J., Camelin, J. C., Mitrani, N., Flamand, F., Uzan, A., Legrand, J. J., et al. (1985). 2-amino-6-trifluoromethoxy benzothiazole, a possible antagonist of excitatory amino acid neurotransmission--II. biochemical properties. *Neuropharmacology*, 24(11), 1085-1092.
- Benetoli, A., Dutra, A. M., Paganelli, R. A., Senda, D. M., Franzin, S., y Milani, H. (2007). Tacrolimus (FK506) reduces hippocampal damage but fails to prevent learning and memory deficits after transient, global cerebral ischemia in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 88(1), 28-38.
- Benn, S. C., Ay, I., Bastia, E., Chian, R. J., Celia, S. A., Pepinsky, R. B., et al. (2005). Tetanus toxin fragment C fusion facilitates protein delivery to CNS neurons from cerebrospinal fluid in mice. *Journal of Neurochemistry*, 95(4), 1118-1131.
- Bennett, M. R., Abbott, M., Everett, A. W., y Lavidis, N. A. (1986). Motoneurone numbers in rat neonatal lateral motor columns: Use of antibody to choline acetyltransferase to identify motoneurons. *Neuroscience Letters*, 63(1), 101-105.
- Bennett, M. R., McGrath, P. A., Davey, D. F., y Hutchinson, I. (1983). Death of motoneurons during the postnatal loss of polyneuronal innervation of rat muscles. *The Journal of Comparative Neurology*, 218(3), 351-363.
- Benveniste, E. N. (1997). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Molecular Medicine*, 75(3), 165-173.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., y Diemer, N. H. (1984). Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 43(5), 1369-1374.
- Benveniste, H., Jorgensen, M. B., Sandberg, M., Christensen, T., Hagberg, H., y Diemer, N. H. (1989). Ischemic damage in hippocampal CA1 is dependent on glutamate release

- and intact innervation from CA3. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 9(5), 629-639.
- Bernardino, L., Xapelli, S., Silva, A. P., Jakobsen, B., Poulsen, F. R., Oliveira, C. R., et al. (2005). Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neuroscience*, 25(29), 6734-6744.
- Bernards, C. M., y Akers, T. (2006). Effect of postinjury intravenous or intrathecal methylprednisolone on spinal cord excitatory amino-acid release, nitric oxide generation, PGE2 synthesis, and myeloperoxidase content in a pig model of acute spinal cord injury. *Spinal Cord*, 44(10), 594-604.
- Bernaudin, M., Marti, H. H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E. T., et al. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(6), 643-651.
- Bernaudin, M., Nouvelot, A., MacKenzie, E. T., y Petit, E. (1998). Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia. *Experimental Neurology*, 150(1), 30-39.
- Bingham, W. G., Goldman, H., Friedman, S. J., Murphy, S., Yashon, D., y Hunt, W. E. (1975). Blood flow in normal and injured monkey spinal cord. *Journal of Neurosurgery*, 43(2), 162-171.
- Bizzini, B., Stoeckel, K., y Schwab, M. (1977). An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: Chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems. *Journal of Neurochemistry*, 28(3), 529-542.
- Blaabjerg, M., Fang, L., Zimmer, J., y Baskys, A. (2003). Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents. *Experimental Neurology*, 183(2), 573-580.
- Blaabjerg, M., Kristensen, B. W., Bonde, C., y Zimmer, J. (2001). The metabotropic glutamate receptor agonist 1S,3R-ACPD stimulates and modulates NMDA receptor mediated excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research*, 898(1), 91-104.
- Blanc, E. M., Keller, J. N., Fernandez, S., y Mattson, M. P. (1998). 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia*, 22(2), 149-160.

- Blight, A. R. (1994). Effects of silica on the outcome from experimental spinal cord injury: Implication of macrophages in secondary tissue damage. *Neuroscience*, 60(1), 263-273.
- Blight, A. R., y Zimber, M. P. (2001). Acute spinal cord injury: Pharmacotherapy and drug development perspectives. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2(6), 801-808.
- Block, F., Schmidt, W., Nolden-Koch, M., y Schwarz, M. (2001). Rolipram reduces excitotoxic neuronal damage. *Neuroreport*, 12(7), 1507-1511.
- Block, M. L., y Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 77-98.
- Bordet, T., Castelnaud-Ptakhine, L., Fauchereau, F., Friocourt, G., Kahn, A., y Haase, G. (2001). Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 17(5), 842-854.
- Borgens, R. B., y Shi, R. (2000). Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. *FASEB Journal*, 14(1), 27-35.
- Bourtchouladze, R., Lidge, R., Catapano, R., Stanley, J., Gossweiler, S., Romashko, D., et al. (2003). A mouse model of rubinstein-taybi syndrome: Defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(18), 10518-10522.
- Bowman, L. J., y Brennan, D. C. (2008). The role of tacrolimus in renal transplantation. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(4), 635-643.
- Bown, C. D., Wang, J. F., Chen, B., y Young, L. T. (2002). Regulation of ER stress proteins by valproate: Therapeutic implications. *Bipolar Disorders*, 4(2), 145-151.
- Bracken, M. B., Collins, W. F., Freeman, D. F., Shepard, M. J., Wagner, F. W., Silten, R. M., et al. (1984). Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA*, 251(1), 45-52.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Collins, W. F., Jr, Holford, T. R., Baskin, D. S., Eisenberg, H. M., et al. (1992). Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. results of the second national acute spinal cord injury study. *Journal of Neurosurgery*, 76(1), 23-31.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Collins, W. F., Holford, T. R., Young, W., Baskin, D. S., et al. (1990). A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the

- treatment of acute spinal-cord injury. results of the second national acute spinal cord injury study. *New England Journal of Medicine*, 322(20), 1405-1411.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Holford, T. R., Leo-Summers, L., Aldrich, E. F., Fazl, M., et al. (1997). Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. results of the third national acute spinal cord injury randomized controlled trial. national acute spinal cord injury study. *JAMA*, 277(20), 1597-1604.
- Bradbury, E. J., King, V. R., Simmons, L. J., Priestley, J. V., y McMahon, S. B. (1998). NT-3, but not BDNF, prevents atrophy and death of axotomized spinal cord projection neurons. *European Journal of Neuroscience*, 10(10), 3058-3068.
- Bramlett, H. M., y Dietrich, W. D. (2007). Progressive damage after brain and spinal cord injury: Pathomechanisms and treatment strategies. *Progress in Brain Research*, 161, 125-141.
- Brand-Schieber, E. y Werner, P. (2003). AMPA/kainate receptors in mouse spinal cord cell-specific display of receptor subunits by oligodendrocytes and astrocytes and at the nodes of Ranvier. *Glia*, 42(1), 12-24.
- Braugher, J. M., y Hall, E. D. (1992). Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *Journal of Neurotrauma*, 9 Suppl 1, S1-7.
- Brecht, S., Schwarze, K., Waetzig, V., Christner, C., Heiland, S., Fischer, G., et al. (2003). Changes in peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity and FK506 binding protein expression following neuroprotection by FK506 in the ischemic rat brain. *Neuroscience*, 120(4), 1037-1048.
- Bredt, D. S., y Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87(2), 682-685.
- Brichta, A., y Grant, G. (1985). Cytoarchitectural organization of the spinal cord. In G. Paxinos (Ed.), *Hindbrain and spinal cord* (pp. 293). Australia: Academic Press Australia.
- Brines, M. L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N. C., Cerami, C., et al. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(19), 10526-10531.

- Bristol, L. A., y Rothstein, J. D. (1996). Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Annals of Neurology*, 39(5), 676-679.
- Brockington, A., Lewis, C., Wharton, S., y Shaw, P. J. (2004). Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30(5), 427-446.
- Brookes, N., y Burt, D. R. (1980). Development of muscarinic receptor binding in spinal cord cell cultures and its reduction by glutamic and kainic acids. *Developmental Neuroscience*, 3(3), 118-127.
- Brown, I. R., y Rush, S. J. (1999). Cellular localization of the heat shock transcription factors HSF1 and HSF2 in the rat brain during postnatal development and following hyperthermia. *Brain Research*, 821(2), 333-340.
- Brown, M. C., Jansen, J. K., y Van Essen, D. (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *Journal of Physiology*, 261(2), 387-422.
- Bruck, W., y Stadelmann, C. (2005). The spectrum of multiple sclerosis: New lessons from pathology. *Current Opinion in Neurology*, 18(3), 221-224.
- Bruijn, L. I., Becher, M. W., Lee, M. K., Anderson, K. L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., et al. (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron*, 18(2), 327-338.
- Bruijn, L. I., Miller, T. M., y Cleveland, D. W. (2004). Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 723-749.
- Brundula, V., Rewcastle, N. B., Metz, L. M., Bernard, C. C., y Yong, V. W. (2002). Targeting leukocyte MMPs and transmigration: Minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain*, 125(Pt 6), 1297-1308.
- Bucolo, C., y Drago, F. (2004). Effects of neurosteroids on ischemia-reperfusion injury in the rat retina: Role of sigma1 recognition sites. *European Journal of Pharmacology*, 498(1-3), 111-114.
- Bucolo, C., Drago, F., Lin, L. R., y Reddy, V. N. (2006). Sigma receptor ligands protect human retinal cells against oxidative stress. *Neuroreport*, 17(3), 287-291.

- Bunge, R. P., Puckett, W. R., y Hiester, E. D. (1997). Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Advances in Neurology*, 72, 305-315.
- Butcher, S. P., Bullock, R., Graham, D. I., y McCulloch, J. (1990). Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 21(12), 1727-1733.
- Carriedo, S. G., Sensi, S. L., Yin, H. Z., y Weiss, J. H. (2000). AMPA exposures induce mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *Journal of Neuroscience*, 20(1), 240-250.
- Carriedo, S. G., Yin, H. Z., Sensi, S. L., y Weiss, J. H. (1998). Rapid  $Ca^{2+}$  entry through  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA/Kainate channels triggers marked intracellular  $Ca^{2+}$  rises and consequent oxygen radical production. *Journal of Neuroscience*, 18(19), 7727-7738.
- Carriedo, S. G., Yin, H. Z., y Weiss, J. H. (1996). Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *Journal of Neuroscience*, 16(13), 4069-4079.
- Casha, S., Yu, W. R., y Fehlings, M. G. (2001). Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, 103(1), 203-218.
- Centuriao, F. B., Corte, C. L., Paixao, M. W., Braga, A. L., Zeni, G., Emanuelli, T., et al. (2005). Effect of ebselen and organochalcogenides on excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina. *Brain Research*, 1039(1-2), 146-152.
- Chaib-Oukadour, I., Gil, C., y Aguilera, J. (2004a). The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Neurochemistry*, 90(5), 1227-1236.
- Chaib-Oukadour, I., Gil, C., y Aguilera, J. (2004b). The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin rescues cerebellar granule neurones from apoptotic death: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of Neurochemistry*, 90(5), 1227-1236.
- Chan, P. H., y Fishman, R. A. (1980). Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *Journal of Neurochemistry*, 35(4), 1004-1007.



- Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., y Schumacker, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95(20), 11715-11720.
- Chen, G., Zeng, W. Z., Yuan, P. X., Huang, L. D., Jiang, Y. M., Zhao, Z. H., et al. (1999). The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *Journal of Neurochemistry*, 72(2), 879-882.
- Chen, P. S., Peng, G. S., Li, G., Yang, S., Wu, X., Wang, C. C., et al. (2006). Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. *Molecular Psychiatry*, 11(12), 1116-1125.
- Chen, P. S., Wang, C. C., Bortner, C. D., Peng, G. S., Wu, X., Pang, H., et al. (2007). Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience*, 149(1), 203-212.
- Chen, R. W., Williams, A. J., Liao, Z., Yao, C., Tortella, F. C., y Dave, J. R. (2007). Broad spectrum neuroprotection profile of phosphodiesterase inhibitors as related to modulation of cell-cycle elements and caspase-3 activation. *Neuroscience Letters*, 418(2), 165-169.
- Cheng, H., Wu, J. P., y Tzeng, S. F. (2002). Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury. *Journal of Neuroscience Research*, 69(3), 397-405.
- Cheng, H. C., Shih, H. M., y Chern, Y. (2002). Essential role of cAMP-response element-binding protein activation by A2A adenosine receptors in rescuing the nerve growth factor-induced neurite outgrowth impaired by blockage of the MAPK cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 33930-33942.
- Cheng, H. Y., Hsieh, M. T., Wu, C. R., Tsai, F. H., Lu, T. C., Hsieh, C. C., et al. (2008). Schizandrin protects primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Journal of Pharmacological Sciences*, 107(1), 21-31.
- Cheramy, A., Barbeito, L., Godeheu, G., y Glowinski, J. (1992). Riluzole inhibits the release of glutamate in the caudate nucleus of the cat in vivo. *Neuroscience Letters*, 147(2), 209-212.

- Cherian, L., Goodman, J. C., y Robertson, C. (2007). Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(2), 789-794.
- Chesler, M., Young, W., Hassan, A. Z., Sakatani, K., y Moriya, T. (1994). Elevation and clearance of extracellular K<sup>+</sup> following graded contusion of the rat spinal cord. *Experimental Neurology*, 125(1), 93-98.
- Chicoine, L. M., y Bahr, B. A. (2007). Excitotoxic protection by polyanionic polysaccharide: Evidence of a cell survival pathway involving AMPA receptor-MAPK interactions. *Journal of Neuroscience Research*, 85(2), 294-302.
- Cho, J. (2006). Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Archives of Pharmacal Research*, 29(8), 699-706.
- Cho, K. O., La, H. O., Cho, Y. J., Sung, K. W., y Kim, S. Y. (2006). Minocycline attenuates white matter damage in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *Journal of Neuroscience Research*, 83(2), 285-291.
- Choi, D. W. (1987a). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 7(2), 369-379.
- Choi, D. W. (1987b). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 7(2), 369-379.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1(8), 623-634.
- Choi, D. W. (1996). Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Current Opinion in Neurobiology*, 6(5), 667-672.
- Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M., y Kriegstein, A. R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *Journal of Neuroscience*, 7(2), 357-368.
- Choi, U. H., Ha, Y., Huang, X., Park, S. R., Chung, J., Hyun, D. K., et al. (2007). Hypoxia-inducible expression of vascular endothelial growth factor for the treatment of spinal cord injury in a rat model. *Journal of Neurosurgery. Spine*, 7(1), 54-60.
- Chong, Z. Z., Kang, J. Q., y Maiese, K. (2003). Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, bad, and caspase-mediated pathways. *British Journal of Pharmacology*, 138(6), 1107-1118.

- Chong, Z. Z., Lin, S. H., Kang, J. Q., y Maiese, K. (2003b). Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *Journal of Neuroscience Research*, 71(5), 659-669.
- Chong, Z. Z., Lin, S. H., y Maiese, K. (2002). Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *Journal of Vascular Research*, 39(2), 131-147.
- Chou, A. K., Yang, L. C., Wu, P. C., Wong, W. T., Liu, G. S., Chen, J. T., et al. (2005). Intrathecal gene delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor ameliorated paraplegia in rats after spinal ischemia. *Molecular Brain Research*, 133(2), 198-207.
- Christophe, M., y Nicolas, S. (2006). Mitochondria: A target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Current Pharmaceutical Design*, 12(6), 739-757.
- Chuang, D. M. (2005). The antiapoptotic actions of mood stabilizers: Molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1053, 195-204.
- Chung, R. S., McCormack, G. H., King, A. E., West, A. K., y Vickers, J. C. (2005). Glutamate induces rapid loss of axonal neurofilament proteins from cortical neurons in vitro. *Experimental Neurology*, 193(2), 481-488.
- Ciabarra, A. M., Sullivan, J. M., Gahn, L. G., Pecht, G., Heinemann, S., y Sevarino, K. A. (1995). Cloning and characterization of chi-1: A developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6498-6508.
- Coen, L., Osta, R., Maury, M., y Brulet, P. (1997). Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94(17), 9400-9405.
- Cohen, J. J. (1993). Apoptosis. *Immunology Today*, 14(3), 126-130.
- Coleman, W. P., y Geisler, F. H. (2004). Injury severity as primary predictor of outcome in acute spinal cord injury: Retrospective results from a large multicenter clinical trial. *Spine Journal*, 4(4), 373-378.

- Collazos-Castro, J. E., Soto, V. M., Gutierrez-Davila, M., y Nieto-Sampedro, M. (2005). Motoneuron loss associated with chronic locomotion impairments after spinal cord contusion in the rat. *Journal of Neurotrauma*, 22(5), 544-558.
- Comoletti, D., Muzio, V., Capobianco, A., Ravizza, T., y Mennini, T. (2001). Nitric oxide produced by non-motoneuron cells enhances rat embryonic motoneuron sensitivity to excitotoxins: Comparison in mixed neuron/glia or purified cultures. *Journal of the Neurological Sciences*, 192(1-2), 61-69.
- Corona, J. C., Tovar-y-Romo, L. B., y Tapia, R. (2007). Glutamate excitotoxicity and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(11), 1415-1428.
- Corse, A. M., Bilak, M. M., Bilak, S. R., Lehar, M., Rothstein, J. D., y Kuncl, R. W. (1999). Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration. *Neurobiology of Disease*, 6(5), 335-346.
- Cotman, C. W., y Monaghan, D. T. (1986). Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their properties. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 203, 237-252.
- Couratier, P., Hugon, J., Sindou, P., Vallat, J. M., y Dumas, M. (1993). Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet*, 341(8840), 265-268.
- CRAIN, S. M., y PETERSON, E. R. (1963). Bioelectric activity in long-term cultures of spinal cord tissues. *Science*, 141, 427-429.
- Crain, S. M., y Peterson, E. R. (1967). Onset and development of functional interneuronal connections in explants of rat spinal cord-ganglia during maturation in culture. *Brain Research*, 6(4), 750-762.
- Cronstein, B. N., Kimmel, S. C., Levin, R. I., Martiniuk, F., y Weissmann, G. (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89(21), 9991-9995.
- Crowe, M. J., Bresnahan, J. C., Shuman, S. L., Masters, J. N., y Beattie, M. S. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Medicine*, 3(1), 73-76.

- Dafny, N. (2008). Sensory systems: Anatomy of the spinal cord. In J. H. Byrne (Ed.), *Neurosciences online: Electronic testbook for the neurosciences*. Houston, Texas: The University of Texas Health Science Center at Houston. <http://neuroscience.uth.tmc.edu/index.htm>
- Dal Canto, M. C., y Gurney, M. E. (1994). Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *American Journal of Pathology*, 145(6), 1271-1279.
- Das, K. P., Freudenrich, T. M., y Mundy, W. R. (2004). Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: A comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(3), 397-406.
- Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., et al. (1998). Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*, 393(6683), 377-381.
- Dawson, T. M., Steiner, J. P., Dawson, V. L., Dinerman, J. L., Uhl, G. R., y Snyder, S. H. (1993). Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90(21), 9808-9812.
- Dawson, V. L., y Dawson, T. M. (2004). Deadly conversations: Nuclear-mitochondrial cross-talk. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(4), 287-294.
- Dawson, V. L., Kizushi, V. M., Huang, P. L., Snyder, S. H., y Dawson, T. M. (1996). Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2479-2487.
- de la Torre, J. C. (1981). Spinal cord injury. review of basic and applied research. *Spine*, 6(4), 315-335.
- De Paola, M., Diana, V., Bigini, P., y Mennini, T. (2008). Morphological features and responses to AMPA receptor-mediated excitotoxicity of mouse motor neurons: Comparison in purified, mixed anterior horn or motor neuron/glia cocultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 170(1), 85-95.
- De Sarno, P., Li, X., y Jope, R. S. (2002). Regulation of akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology*, 43(7), 1158-1164.

- Debono, M. W., Le Guern, J., Canton, T., Doble, A., y Pradier, L. (1993). Inhibition by riluzole of electrophysiological responses mediated by rat kainate and NMDA receptors expressed in xenopus oocytes. *European Journal of Pharmacology*, 235(2-3), 283-289.
- DeCoster, M. A., Klette, K. L., Knight, E. S., y Tortella, F. C. (1995). Sigma receptor-mediated neuroprotection against glutamate toxicity in primary rat neuronal cultures. *Brain Research*, 671(1), 45-53.
- Deinhardt, K., Berninghausen, O., Willison, H. J., Hopkins, C. R., y Schiavo, G. (2006). Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *Journal of Cell Biology*, 174(3), 459-471.
- Delfs, J., Friend, J., Ishimoto, S., y Saroff, D. (1989). Ventral and dorsal horn acetylcholinesterase neurons are maintained in organotypic cultures of postnatal rat spinal cord explants. *Brain Research*, 488(1-2), 31-42.
- Demopoulos, H. B., Flamm, E. S., Pietronigro, D. D., y Seligman, M. L. (1980). The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 492, 91-119.
- Demopoulos, H. B., Flamm, E. S., Seligman, M. L., Pietronigro, D. D., Tomasula, J., y DeCrescito, V. (1982a). Further studies on free-radical pathology in the major central nervous system disorders: Effect of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology, and chemistry of experimental spinal cord impact injury. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(11), 1415-1424.
- Demopoulos, H. B., Flamm, E. S., Seligman, M. L., Pietronigro, D. D., Tomasula, J., y DeCrescito, V. (1982b). Further studies on free-radical pathology in the major central nervous system disorders: Effect of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology, and chemistry of experimental spinal cord impact injury. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(11), 1415-1424.
- Dennis, M. J., Ziskind-Conhaim, L., y Harris, A. J. (1981). Development of neuromuscular junctions in rat embryos. *Developmental Biology*, 81(2), 266-279.
- Deshpande, L. S., Limbrick, D. D., Jr, Sombati, S., y DeLorenzo, R. J. (2007). Activation of a novel injury-induced calcium-permeable channel that plays a key

- role in causing extended neuronal depolarization and initiating neuronal death in excitotoxic neuronal injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(2), 443-452.
- Didier, M., Heaulme, M., Soubrie, P., Bockaert, J., y Pin, J. P. (1990). Rapid, sensitive, and simple method for quantification of both neurotoxic and neurotrophic effects of NMDA on cultured cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience Research*, 27(1), 25-35.
- Digicaylioglu, M., Bichet, S., Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L. A., Bauer, C., et al. (1995). Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 92(9), 3717-3720.
- Digicaylioglu, M., y Lipton, S. A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*, 412(6847), 641-647.
- Doble, A. (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology*, 47(6 Suppl 4), S233-41.
- Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 81(3), 163-221.
- Doble, A., Hubert, J. P., y Blanchard, J. C. (1992). Pertussis toxin pretreatment abolishes the inhibitory effect of riluzole and carbachol on D-[3H]aspartate release from cultured cerebellar granule cells. *Neuroscience Letters*, 140(2), 251-254.
- Dobrenis, K., Joseph, A., y Rattazzi, M. C. (1992). Neuronal lysosomal enzyme replacement using fragment C of tetanus toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89(6), 2297-2301.
- Dohrmann, G. J., y Allen, W. E. (1975). Microcirculation of traumatized spinal cord. A correlation of microangiography and blood flow patterns in transitory and permanent paraplegia. *Journal of Trauma*, 15(11), 1003-1013.
- Dohrmann, G. J., y Wick, K. M. (1973). Intramedullary blood flow patterns in transitory traumatic paraplegia. *Surgical Neurology*, 1(4), 209-215.
- Dommergues, M. A., Plaisant, F., Verney, C., y Gressens, P. (2003). Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice: A potential target for neuroprotection. *Neuroscience*, 121(3), 619-628.

- Draelos, Z. D. (2008). Use of topical corticosteroids and topical calcineurin inhibitors for the treatment of atopic dermatitis in thin and sensitive skin areas. *Current Medical Research and Opinion*, 24(4), 985-994.
- Dragunow, M., Greenwood, J. M., Cameron, R. E., Narayan, P. J., O'Carroll, S. J., Pearson, A. G., et al. (2006). Valproic acid induces caspase 3-mediated apoptosis in microglial cells. *Neuroscience*, 140(4), 1149-1156.
- Dubreuil, C. I., Winton, M. J., y McKerracher, L. (2003). Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated rho in apoptosis in the central nervous system. *Journal of Cell Biology*, 162(2), 233-243.
- Duchemin, A. M., Ren, Q., Mo, L., Neff, N. H., y Hadjiconstantinou, M. (2002). GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of trk and erk in brain. *Journal of Neurochemistry*, 81(4), 696-707.
- Ducker, T. B., y Zeidman, S. M. (1994). Spinal cord injury. role of steroid therapy. *Spine*, 19(20), 2281-2287.
- Dumont, R. J., Verma, S., Okonkwo, D. O., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., et al. (2001). Acute spinal cord injury, part II: Contemporary pharmacotherapy. *Clinical Neuropharmacology*, 24(5), 265-279.
- Duong, F. H., Warter, J. M., Poindron, P., y Passilly, P. (1999). Effect of the nonpeptide neurotrophic compound SR 57746A on the phenotypic survival of purified mouse motoneurons. *British Journal of Pharmacology*, 128(7), 1385-1392.
- Durkin, J. P., Tremblay, R., Chakravarthy, B., Mealing, G., Morley, P., Small, D., et al. (1997). Evidence that the early loss of membrane protein kinase C is a necessary step in the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 68(4), 1400-1412.
- Dykens, J. A. (1994). Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated  $CA^{2+}$  and  $na^{+}$ : Implications for neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 63(2), 584-591.
- Ehrenreich, H., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Cepek, L., Lewczuk, P., Stiefel, M., et al. (2002). Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular Medicine*, 8(8), 495-505.



- Einat, H., Yuan, P., Gould, T. D., Li, J., Du, J., Zhang, L., et al. (2003). The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *Journal of Neuroscience*, 23(19), 7311-7316.
- Ellezam, B., Dubreuil, C., Winton, M., Loy, L., Dergham, P., Selles-Navarro, I., et al. (2002). Inactivation of intracellular rho to stimulate axon growth and regeneration. *Progress in Brain Research*, 137, 371-380.
- Elliott-Hunt, C. R., Marsh, B., Bacon, A., Pope, R., Vanderplank, P., y Wynick, D. (2004). Galanin acts as a neuroprotective factor to the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101(14), 5105-5110.
- Emery, E., Aldana, P., Bunge, M. B., Puckett, W., Srinivasan, A., Keane, R. W., et al. (1998). Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, 89(6), 911-920.
- Erbayraktar, S., Grasso, G., Sfacteria, A., Xie, Q. W., Coleman, T., Kreilgaard, M., et al. (2003a). Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(11), 6741-6746.
- Erbayraktar, S., Grasso, G., Sfacteria, A., Xie, Q. W., Coleman, T., Kreilgaard, M., et al. (2003b). Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(11), 6741-6746.
- Estevez, A. G., Stutzmann, J. M., y Barbeito, L. (1995). Protective effect of riluzole on excitatory amino acid-mediated neurotoxicity in motoneuron-enriched cultures. *European Journal of Pharmacology*, 280(1), 47-53.
- Estrada Sanchez, A. M., Mejia-Toiber, J., y Massieu, L. (2008). Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of huntington's disease. *Archives of Medical Research*, 39(3), 265-276.
- Evans, M. S., Collings, M. A., y Brewer, G. J. (1998). Electrophysiology of embryonic, adult and aged rat hippocampal neurons in serum-free culture. *Journal of Neuroscience Methods*, 79(1), 37-46.
- Faden, A. I. (1997). Therapeutic approaches to spinal cord injury. *Advances in Neurology*, 72, 377-386.

- Faden, A. I., Chan, P. H., y Longar, S. (1987). Alterations in lipid metabolism,  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase activity, and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury. *Journal of Neurochemistry*, 48(6), 1809-1816.
- Faden, A. I., Lemke, M., Simon, R. P., y Noble, L. J. (1988). N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: Behavioral, anatomic, and neurochemical studies. *Journal of Neurotrauma*, 5(1), 33-45.
- Faden, A. I., Movsesyan, V. A., Fang, X., y Wang, S. (2005). Identification of novel neuroprotective agents using pharmacophore modeling. *Chemistry and Biodiversity*, 2(11), 1564-1570.
- Fairholm, D., y Turnbull, I. (1970). Microangiographic study of experimental spinal injuries in dogs and rabbits. *Surgical Forum*, 21, 453-455.
- Favaron, M., Manev, H., Siman, R., Bertolino, M., Szekely, A. M., DeErasquin, G., et al. (1990). Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87(5), 1983-1987.
- Fehlings, M. G., y Baptiste, D. C. (2005). Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury*, 36 Suppl 2, B113-22.
- Fehlings, M. G., Tator, C. H., y Linden, R. D. (1989). The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, 71(3), 403-416.
- Felten, D., L., y Józefowicz, R. (2003). In Kelly P., Surich J. (Eds.), *Netter's atlas of human neuroscience* (First ed.). Teterboro, New Jersey: Icon Learning Systems.
- Feng, H. L., Leng, Y., Ma, C. H., Zhang, J., Ren, M., y Chuang, D. M. (2008). Combined lithium and valproate treatment delays disease onset, reduces neurological deficits and prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neuroscience*, 155(3), 567-572.
- Festoff, B. W., Ameenuddin, S., Arnold, P. M., Wong, A., Santacruz, K. S., y Citron, B. A. (2006). Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry*, 97(5), 1314-1326.

- Fincato, G., Polentarutti, N., Sica, A., Mantovani, A., y Colotta, F. (1991). Expression of a heat-inducible gene of the HSP70 family in human myelomonocytic cells: Regulation by bacterial products and cytokines. *Blood*, 77(3), 579-586.
- Fishman, P. S., y Carrigan, D. R. (1988). Motoneuron uptake from the circulation of the binding fragment of tetanus toxin. *Archives of Neurology*, 45(5), 558-561.
- Foroutan, A., Behbahan, M. M., y Anderson, D. K. (1996). Effects of methylprednisolone on the GABA- and glutamate-induced currents: Relevance to glucocorticoid-induced neurotoxicity and brain aging. *Steroids*, 61(6), 354-366.
- Fraher, J. P., y O'Sullivan, V. R. (1989). Age changes in axon number along the cervical ventral spinal nerve roots in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 280(2), 171-182.
- Frandsen, A., y Schousboe, A. (1992). Mobilization of dantrolene-sensitive intracellular calcium pools is involved in the cytotoxicity induced by quisqualate and N-methyl-D-aspartate but not by 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionate and kainate in cultured cerebral cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89(7), 2590-2594.
- Fried, L. C., y Goodkin, R. (1971). Microangiographic observations of the experimentally traumatized spinal cord. *Journal of Neurosurgery*, 35(6), 709-714.
- Frizzo, M. E., Dall'Onder, L. P., Dalcin, K. B., y Souza, D. O. (2004). Riluzole enhances glutamate uptake in rat astrocyte cultures. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24(1), 123-128.
- Fukaya, M., Hayashi, Y., y Watanabe, M. (2005). NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. *European Journal of Neuroscience*, 21(5), 1432-1436.
- Fukumoto, T., Morinobu, S., Okamoto, Y., Kagaya, A., y Yamawaki, S. (2001). Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology*, 158(1), 100-106.
- Fumagalli, E., Bigini, P., Barbera, S., De Paola, M., y Mennini, T. (2006). Riluzole, unlike the AMPA antagonist RPR119990, reduces motor impairment and

- partially prevents motoneuron death in the wobbler mouse, a model of neurodegenerative disease. *Experimental Neurology*, 198(1), 114-128.
- Furuichi, Y., Maeda, M., Moriguchi, A., Sawamoto, T., Kawamura, A., Matsuoka, N., et al. (2003). Tacrolimus, a potential neuroprotective agent, ameliorates ischemic brain damage and neurologic deficits after focal cerebral ischemia in nonhuman primates. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(10), 1183-1194.
- Gahwiler, B. H., Capogna, M., Debanne, D., McKinney, R. A., y Thompson, S. M. (1997). Organotypic slice cultures: A technique has come of age. *Trends in Neurosciences*, 20(10), 471-477.
- Garcia-Alias, G., Valero-Cabre, A., Lopez-Vales, R., Fores, J., Verdu, E., y Navarro, X. (2006). Differential motor and electrophysiological outcome in rats with mid-thoracic or high lumbar incomplete spinal cord injuries. *Brain Research*, 1108(1), 195-204.
- Gassmann, M., Heinicke, K., Soliz, J., y Ogunshola, O. O. (2003). Non-erythroid functions of erythropoietin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 543, 323-330.
- Gaviria, M., Privat, A., d'Arbigny, P., Kamenka, J., Haton, H., y Ohanna, F. (2000a). Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Research*, 874(2), 200-209.
- Gaviria, M., Privat, A., d'Arbigny, P., Kamenka, J. M., Haton, H., y Ohanna, F. (2000b). Neuroprotective effects of gacyclidine after experimental photochemical spinal cord lesion in adult rats: Dose-window and time-window effects. *Journal of Neurotrauma*, 17(1), 19-30.
- Geisler, F. H., Coleman, W. P., Grieco, G., Poonian, D., y Sygen Study Group. (2001). The sygen multicenter acute spinal cord injury study. *Spine*, 26(24 Suppl), S87-98.
- Geisler, F. H., Dorsey, F. C., y Coleman, W. P. (1991). Correction: Recovery of motor function after spinal-cord injury--a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *New England Journal of Medicine*, 325(23), 1659-1660.

- Gemba, T., Oshima, T., y Ninomiya, M. (1994). Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. *Neuroscience*, 63(3), 789-795.
- Genc, K., Genc, S., Baskin, H., y Semin, I. (2006). Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes. *Physiological Research*, 55(1), 33-38.
- Gerritsen, M. E., Williams, A. J., Neish, A. S., Moore, S., Shi, Y., y Collins, T. (1997). CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94(7), 2927-2932.
- Ghezzi, P., y Brines, M. (2004). Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death and Differentiation*, 11 Suppl 1, S37-44.
- Gil, C., Chaib-Oukadour, I., y Aguilera, J. (2003). C-terminal fragment of tetanus toxin heavy chain activates akt and MEK/ERK signalling pathways in a trk receptor-dependent manner in cultured cortical neurons. *Biochemical Journal*, 373(Pt 2), 613-620.
- Gil, C., Chaib-Oukadour, I., Blasi, J., y Aguilera, J. (2001). HC fragment (C-terminal portion of the heavy chain) of tetanus toxin activates protein kinase C isoforms and phosphoproteins involved in signal transduction. *Biochemical Journal*, 356(Pt 1), 97-103.
- Gil, C., Chaib-Oukadour, I., Pelliccioni, P., y Aguilera, J. (2000). Activation of signal transduction pathways involving trkA, PLCgamma-1, PKC isoforms and ERK-1/2 by tetanus toxin. *FEBS Letters*, 481(2), 177-182.
- Gilgun-Sherki, Y., Panet, H., Melamed, E., y Offen, D. (2003). Riluzole suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: Implications for the treatment of multiple sclerosis. *Brain Research*, 989(2), 196-204.
- Giordani, F., Benetolli, A., Favero-Filho, L. A., Lima, K. C., Cestari Junior, L., y Milani, H. (2003). Tacrolimus (FK506) reduces ischemia-induced hippocampal damage in rats: A 7- and 30-day study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(4), 495-502.
- Glassford, A., Lee, J. E., Xu, L., y Giffard, R. G. (2002). Caspase inhibitors reduce the apoptotic but not necrotic component of kainate injury in primary murine cortical neuronal cultures. *Neurological Research*, 24(8), 796-800.

- Gold, B. G. (1999). FK506 and the role of the immunophilin FKBP-52 in nerve regeneration. *Drug Metabolism Reviews*, 31(3), 649-663.
- Gold, B. G. (2000). Neuroimmunophilin ligands and the role of steroid receptor chaperone proteins in nerve regeneration. In B. G. Gold, F. Gunter y T. Herdegen (Eds.), *Immunophilins in the brain. FKBP ligands: Novel strategies for the treatment of neurodegenerative Disorders* (pp. 3-22) Prous Science.
- Gold, B. G., Armistead, D. M., y Wang, M. S. (2005). Non-FK506-binding protein-12 neuroimmunophilin ligands increase neurite elongation and accelerate nerve regeneration. *Journal of Neuroscience Research*, 80(1), 56-65.
- Gold, B. G., Densmore, V., Shou, W., Matzuk, M. M., y Gordon, H. S. (1999). Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), 1202-1210.
- Gold, B. G., y Nutt, J. G. (2002). Neuroimmunophilin ligands in the treatment of parkinson's disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 2(1), 82-86.
- Gold, B. G., Udina, E., Bourdette, D., y Navarro, X. (2004). Neuroregenerative and neuroprotective actions of neuroimmunophilin compounds in traumatic and inflammatory neuropathies. *Neurological Research*, 26(4), 371-380.
- Gold, B. G., y Villafranca, J. E. (2003a). Neuroimmunophilin ligands: The development of novel neuroregenerative/ neuroprotective compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(12), 1368-1375.
- Gold, B. G., Voda, J., Yu, X., y Gordon, H. (2004). The immunosuppressant FK506 elicits a neuronal heat shock response and protects against acrylamide neuropathy. *Experimental Neurology*, 187(1), 160-170.
- Gold, B. G., y Zhong, Y. P. (2004). FK506 requires stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and the steroid receptor chaperone protein p23 for neurite elongation. *Neuro-Signals*, 13(3), 122-129.
- Gonzalez, S. L., Labombarda, F., Deniselle, M. C., Mougel, A., Guennoun, R., Schumacher, M., et al. (2005). Progesterone neuroprotection in spinal cord trauma involves up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in motoneurons. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(1-3), 143-149.

- Gorio, A., Gokmen, N., Erbayraktar, S., Yilmaz, O., Madaschi, L., Cichetti, C., et al. (2002). Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99(14), 9450-9455.
- Gorio, A., Madaschi, L., Di Stefano, B., Carelli, S., Di Giulio, A. M., De Biasi, S., et al. (2005). Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102(45), 16379-16384.
- Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., et al. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal*, 20(24), 6969-6978.
- Goyagi, T., Goto, S., Bhardwaj, A., Dawson, V. L., Hurn, P. D., y Kirsch, J. R. (2001). Neuroprotective effect of sigma(1)-receptor ligand 4-phenyl-1-(4-phenylbutyl) piperidine (PPBP) is linked to reduced neuronal nitric oxide production. *Stroke*, 32(7), 1613-1620.
- Grasso, G., Sfacteria, A., Passalacqua, M., Morabito, A., Buemi, M., Macri, B., et al. (2005). Erythropoietin and erythropoietin receptor expression after experimental spinal cord injury encourages therapy by exogenous erythropoietin. *Neurosurgery*, 56(4), 821-827.
- 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. *Journal of Neurochemistry*, 74(1), 179-191.
- Griffiths, I. R. (1976). Spinal cord blood flow after acute experimental cord injury in dogs. *Journal of the Neurological Sciences*, 27(2), 247-259.
- Griffiths, I. R., y Miller, R. (1974). Vascular permeability to protein and vasogenic oedema in experimental concussive injuries to the canine spinal cord. *Journal of the Neurological Sciences*, 22(3), 291-304.
- Gundlach, A. L., Largent, B. L., y Snyder, S. H. (1986). Autoradiographic localization of sigma receptor binding sites in guinea pig and rat central nervous system with (+)3H-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine. *Journal of Neuroscience*, 6(6), 1757-1770.

- Guo, X., Dawson, V. L., y Dawson, T. M. (2001). Neuroimmunophilin ligands exert neuroregeneration and neuroprotection in midbrain dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 13(9), 1683-1693.
- Haase, P. (1990). Explanation for the labeling of cervical motoneurons in young rats following the introduction of horseradish peroxidase into the calf. *Journal of Comparative Neurology*, 297(3), 471-478.
- Habermann, E., y Dreyer, F. (1986). Clostridial neurotoxins: Handling and action at the cellular and molecular level. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 129, 93-179.
- Hall, E. D. (1993). Lipid antioxidants in acute central nervous system injury. *Annals of Emergency Medicine*, 22(6), 1022-1027.
- Hall, E. D., y Braughler, J. M. (1982). Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPase activity. dose-response analysis during 1st hour after contusion injury in the cat. *Journal of Neurosurgery*, 57(2), 247-253.
- Hall, E. D., y Braughler, J. M. (1986). Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration: A review. *Central Nervous System Trauma*, 3(4), 281-294.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.
- Hannila, S. S., y Filbin, M. T. (2008). The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 209(2), 321-332.
- Harada S. (1996). Intraspinial level of motoneurons innervating cervical nerve roots and forefoot muscles of the rat. *Journal of Orthopedic Science*, 1(4), 277-285.
- Hashimoto, R., Hough, C., Nakazawa, T., Yamamoto, T., y Chuang, D. M. (2002a). Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: Involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *Journal of Neurochemistry*, 80(4), 589-597.
- Hashimoto, R., Hough, C., Nakazawa, T., Yamamoto, T., y Chuang, D. M. (2002b). Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: Involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *Journal of Neurochemistry*, 80(4), 589-597.



- Hasselblatt, M., Ehrenreich, H., y Siren, A. L. (2006). The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*, 18(2), 132-138.
- Hayashi, N., Green, B. A., Gonzalez-Carvajal, M., Mora, J., y Veraa, R. P. (1983a). Local blood flow, oxygen tension, and oxygen consumption in the rat spinal cord. part 1: Oxygen metabolism and neuronal function. *Journal of Neurosurgery*, 58(4), 516-525.
- Hayashi, N., Green, B. A., Gonzalez-Carvajal, M., Mora, J., y Veraa, R. P. (1983b). Local blood flow, oxygen tension, and oxygen consumption in the rat spinal cord. part 2: Relation to segmental level. *Journal of Neurosurgery*, 58(4), 526-530.
- Hayashi, T., y Su, T. P. (2001). Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98(2), 491-496.
- Hebert, T., Drapeau, P., Pradier, L., y Dunn, R. J. (1994). Block of the rat brain IIA sodium channel alpha subunit by the neuroprotective drug riluzole. *Molecular Pharmacology*, 45(5), 1055-1060.
- Hemmer, B., y Hartung, H. P. (2007). Toward the development of rational therapies in multiple sclerosis: What is on the horizon? *Annals of Neurology*, 62(4), 314-326.
- Herreros, J., Ng, T., y Schiavo, G. (2001). Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Molecular Biology of the Cell*, 12(10), 2947-2960.
- Heyes, M. P., Achim, C. L., Wiley, C. A., Major, E. O., Saito, K., y Markey, S. P. (1996). Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochemical Journal*, 320 ( Pt 2)(Pt 2), 595-597.
- Hiroi, T., Wei, H., Hough, C., Leeds, P., y Chuang, D. M. (2005). Protracted lithium treatment protects against the ER stress elicited by thapsigargin in rat PC12 cells: Roles of intracellular calcium, GRP78 and bcl-2. *Pharmacogenomics Journal*, 5(2), 102-111.
- Hollmann, M., Hartley, M., y Heinemann, S. (1991). Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252(5007), 851-853.

- Hollmann, M., y Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 31-108.
- Hsieh, J., y Gage, F. H. (2005). Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 664-671.
- Hsieh, J., Nakashima, K., Kuwabara, T., Mejia, E., y Gage, F. H. (2004). Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101(47), 16659-16664.
- Hsu, C. Y., Hogan, E. L., Gadsden RH, S., Spicer, K. M., Shi, M. P., y Cox, R. D. (1985). Vascular permeability in experimental spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 70(3), 275-282.
- Iannotti, C., Ping Zhang, Y., Shields, C. B., Han, Y., Burke, D. A., y Xu, X. M. (2004). A neuroprotective role of glial cell line-derived neurotrophic factor following moderate spinal cord contusion injury. *Experimental Neurology*, 189(2), 317-332.
- Ibarra, A., y Diaz-Ruiz, A. (2006). Protective effect of cyclosporin-A in spinal cord injury: An overview. *Current Medicinal Chemistry*, 13(22), 2703-2710.
- Impey, S., McCorkle, S. R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J. M., Yochum, G. S., Boss, J. M., et al. (2004). Defining the CREB regulon: A genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell*, 119(7), 1041-1054.
- Jahn, K., Grosskreutz, J., Haastert, K., Ziegler, E., Schlesinger, F., Grothe, C., et al. (2006). Temporospacial coupling of networked synaptic activation of AMPA-type glutamate receptor channels and calcium transients in cultured motoneurons. *Neuroscience*, 142(4), 1019-1029.
- Jin, S. L., Richard, F. J., Kuo, W. P., D'Ercole, A. J., y Conti, M. (1999). Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96(21), 11998-12003.
- Joo, N. E., y Park, C. S. (2003). Inhibition of excitotoxicity in cultured rat cortical neurons by a mixture of conjugated linoleic acid isomers. *Pharmacological Research*, 47(4), 305-310.

- Juul, S. E., Anderson, D. K., Li, Y., y Christensen, R. D. (1998). Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatric Research*, 43(1), 40-49.
- Kabadere, S., Oztopcu, P., Korkmaz, S., Erol, K., y Uyar, R. (2004). MgSO<sub>4</sub> and lazardoid (U-83836E) partially protects glioma cells against glutamate toxicity in vitro. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 64(4), 461-466.
- Kanai, H., Sawa, A., Chen, R. W., Leeds, P., y Chuang, D. M. (2004). Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. *Pharmacogenomics Journal*, 4(5), 336-344.
- Kang, J. Q., Chong, Z. Z., y Maiese, K. (2003). Akt1 protects against inflammatory microglial activation through maintenance of membrane asymmetry and modulation of cysteine protease activity. *Journal of Neuroscience Research*, 74(1), 37-51.
- Kao, C. H., Chen, S. H., Chio, C. C., Chang, C. K., y Lin, M. T. (2008). Exogenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor improves recovery after spinal cord injury. *Resuscitation*, 77(3), 395-400.
- Kaplan, D. R., y Miller, F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3), 381-391.
- Kaptanoglu, E., Solaroglu, I., Okutan, O., Surucu, H. S., Akbiyik, F., y Beskonakli, E. (2004). Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: Effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurgical Review*, 27(2), 113-120.
- Karanian, D. A., Baude, A. S., Brown, Q. B., Parsons, C. G., y Bahr, B. A. (2006). 3-nitropropionic acid toxicity in hippocampus: Protection through N-methyl-D-aspartate receptor antagonism. *Hippocampus*, 16(10), 834-842.
- Katoh-Semba, R., Asano, T., Ueda, H., Morishita, R., Takeuchi, I. K., Inaguma, Y., et al. (2002). Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB Journal*, 16(10), 1328-1330.
- Kawasaki, H., Morooka, T., Shimohama, S., Kimura, J., Hirano, T., Gotoh, Y., et al. (1997). Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase

- in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18518-18521.
- Kaymaz, M., Emmez, H., Bukan, N., Dursun, A., Kurt, G., Pasaoglu, H., et al. (2005). Effectiveness of FK506 on lipid peroxidation in the spinal cord following experimental traumatic injury. *Spinal Cord*, 43(1), 22-26.
- Keller, J. N., Kindy, M. S., Holtsberg, F. W., St Clair, D. K., Yen, H. C., Germeyer, A., et al. (1998). Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: Suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Journal of Neuroscience*, 18(2), 687-697.
- Kennedy, S. G., Kandel, E. S., Cross, T. K., y Hay, N. (1999). Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5800-5810.
- Keynes, R. G., Duport, S., y Garthwaite, J. (2004). Hippocampal neurons in organotypic slice culture are highly resistant to damage by endogenous and exogenous nitric oxide. *European Journal of Neuroscience*, 19(5), 1163-1173.
- Khaspekov, L. G., Brenz Verca, M. S., Frumkina, L. E., Hermann, H., Marsicano, G., y Lutz, B. (2004). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *European Journal of Neuroscience*, 19(7), 1691-1698.
- Kiedrowski, L., Wroblewski, J. T., y Costa, E. (1994). Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate. *Molecular Pharmacology*, 45(5), 1050-1054.
- Kilmer, S. L., y Carlsen, R. C. (1984). Forskolin activation of adenylate cyclase in vivo stimulates nerve regeneration. *Nature*, 307(5950), 455-457.
- Kim, A. J., Shi, Y., Austin, R. C., y Werstuck, G. H. (2005). Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 1), 89-99.
- Kim, H. W., Roh, D. H., Yoon, S. Y., Seo, H. S., Kwon, Y. B., Han, H. J., et al. (2008). Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *British Journal of Pharmacology*,

- Klette, K. L., DeCoster, M. A., Moreton, J. E., y Tortella, F. C. (1995). Role of calcium in sigma-mediated neuroprotection in rat primary cortical neurons. *Brain Research*, 704(1), 31-41.
- Kobrine, A. I., Doyle, T. F., y Martins, A. N. (1975). Local spinal cord blood flow in experimental traumatic myelopathy. *Journal of Neurosurgery*, 42(2), 144-149.
- Koch, R. A., y Barish, M. E. (1994). Perturbation of intracellular calcium and hydrogen ion regulation in cultured mouse hippocampal neurons by reduction of the sodium ion concentration gradient. *Journal of Neuroscience*, 14(5 Pt 1), 2585-2593.
- Kontogeorgakos, V. A., Voulgaris, S., Korompilias, A. V., Vekris, M., Polyzoidis, K. S., Bourantas, K., et al. (2008). The efficacy of erythropoietin on acute spinal cord injury. an experimental study on a rat model. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*,
- Koo, K. A., Kim, S. H., Oh, T. H., y Kim, Y. C. (2006a). Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Life Sciences*, 79(7), 709-716.
- Koo, K. A., Kim, S. H., Oh, T. H., y Kim, Y. C. (2006b). Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Life Sciences*, 79(7), 709-716.
- Kosacka, J., Figiel, M., Engele, J., Hilbig, H., Majewski, M., y Spaniel-Borowski, K. (2005). Angiopoietin-1 promotes neurite outgrowth from dorsal root ganglion cells positive for tie-2 receptor. *Cell and Tissue Research*, 320(1), 11-19.
- Koszdin, K. L., Shen, D. D., y Bernards, C. M. (2000). Spinal cord bioavailability of methylprednisolone after intravenous and intrathecal administration: The role of P-glycoprotein. *Anesthesiology*, 92(1), 156-163.
- Krassioukov, A. V., Ackery, A., Schwartz, G., Adamchik, Y., Liu, Y., y Fehlings, M. G. (2002). An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. *Brain Research Protocols*, 10(2), 60-68.
- Krause, W., y Kuhne, G. (1988). Pharmacokinetics of rolipram in the rhesus and cynomolgus monkeys, the rat and the rabbit. studies on species differences. *Xenobiotica*, 18(5), 561-571.

- Kristensen, B. W., Noraberg, J., Jakobsen, B., Gramsbergen, J. B., Ebert, B., y Zimmer, J. (1999). Excitotoxic effects of non-NMDA receptor agonists in organotypic corticostriatal slice cultures. *Brain Research*, 841(1-2), 143-159.
- Kristensen, B. W., Noraberg, J., y Zimmer, J. (2001). Comparison of excitotoxic profiles of ATPA, AMPA, KA and NMDA in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research*, 917(1), 21-44.
- Kristensen, B. W., Noraberg, J., y Zimmer, J. (2003). The GABAA receptor agonist THIP is neuroprotective in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research*, 973(2), 303-306.
- Kurihara, M. (1985). Role of monoamines in experimental spinal cord injury in rats. relationship between  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase and lipid peroxidation. *Journal of Neurosurgery*, 62(5), 743-749.
- Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., et al. (1996). Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron*, 16(2), 333-344.
- Kwo, S., Young, W., y Decrescito, V. (1989). Spinal cord sodium, potassium, calcium, and water concentration changes in rats after graded contusion injury. *Journal of Neurotrauma*, 6(1), 13-24.
- Kwon, B. K., Tetzlaff, W., Grauer, J. N., Beiner, J., y Vaccaro, A. R. (2004). Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine Journal*, 4(4), 451-464.
- Kwong, J. Q., Beal, M. F., y Manfredi, G. (2006). The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1659-1675.
- Labombarda, F., Gonzalez, S. L., Gonzalez, D. M., Guennoun, R., Schumacher, M., y de Nicola, A. F. (2002). Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*, 19(3), 343-355.
- Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., y Schiavo, G. (2003a). The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends in Microbiology*, 11(9), 431-437.

- Lalli, G., y Schiavo, G. (2002). Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *The Journal of Cell Biology*, 156(2), 233-239.
- Lamas, M., Lee-Rivera, I., y Lopez-Colome, A. M. (2005). Cell-specific expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in muller glia and neurons from the chick retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(10), 3570-3577.
- Larsen, K. E., Benn, S. C., Ay, I., Chian, R. J., Celia, S. A., Remington, M. P., et al. (2006). A glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF):Tetanus toxin fragment C protein conjugate improves delivery of GDNF to spinal cord motor neurons in mice. *Brain Research*, 1120(1), 1-12.
- Laverty, P. H., Leskovar, A., Breur, G. J., Coates, J. R., Bergman, R. L., Widmer, W. R., et al. (2004). A preliminary study of intravenous surfactants in paraplegic dogs: Polymer therapy in canine clinical SCI. *Journal of Neurotrauma*, 21(12), 1767-1777.
- Lebeurrier, N., Liot, G., Lopez-Atalaya, J. P., Orset, C., Fernandez-Monreal, M., Sonderegger, P., et al. (2005). The brain-specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 30(4), 552-558.
- Lei, S. Z., Zhang, D., Abele, A. E., y Lipton, S. A. (1992). Blockade of NMDA receptor-mediated mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> prevents neurotoxicity. *Brain Research*, 598(1-2), 196-202.
- Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., et al. (2004). Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*, 305(5681), 239-242.
- Leist, M., y Nicotera, P. (1998). Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Experimental Cell Research*, 239(2), 183-201.
- Leng, Y., y Chuang, D. M. (2006). Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 26(28), 7502-7512.
- Leonard, B. E. (2007). Inflammation, depression and dementia: Are they connected? *Neurochemical Research*, 32(10), 1749-1756.

- Lepeintre, J. F., D'Arbigny, P., Mathe, J. F., Vigue, B., Loubert, G., Delcour, J., et al. (2004). Neuroprotective effect of gacyclidine. A multicenter double-blind pilot trial in patients with acute traumatic brain injury. *Neuro-Chirurgie*, 50(2-3 Pt 1), 83-95.
- Lesage, A. S., De Loore, K. L., Peeters, L., y Leysen, J. E. (1995). Neuroprotective sigma ligands interfere with the glutamate-activated NOS pathway in hippocampal cell culture. *Synapse*, 20(2), 156-164.
- Li, J. Y., Furuichi, Y., Matsuoka, N., Mutoh, S., y Yanagihara, T. (2006). Tacrolimus (FK506) attenuates biphasic cytochrome c release and bad phosphorylation following transient cerebral ischemia in mice. *Neuroscience*, 142(3), 789-797.
- Li, Y., Yuan, Z., Liu, B., Sailhamer, E. A., Shults, C., Velmahos, G. C., et al. (2008). Prevention of hypoxia-induced neuronal apoptosis through histone deacetylase inhibition. *Journal of Trauma*, 64(4), 863-870.
- Liang, F. Q., Green, L., Wang, C., Alssadi, R., y Godley, B. F. (2004). Melatonin protects human retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative stress. *Experimental Eye Research*, 78(6), 1069-1075.
- Lin, S. H., y Maiese, K. (2001). The metabotropic glutamate receptor system protects against ischemic free radical programmed cell death in rat brain endothelial cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(3), 262-275.
- Lipton, S. A., y Rosenberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*, 330(9), 613-622.
- Liu, D., y McAdoo, D. J. (1993). Methylprednisolone reduces excitatory amino acid release following experimental spinal cord injury. *Brain Research*, 609(1-2), 293-297.
- Liu, D., Thangnipon, W., y McAdoo, D. J. (1991). Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Research*, 547(2), 344-348.
- Liu, W., Liu, R., Chun, J. T., Bi, R., Hoe, W., Schreiber, S. S., et al. (2001). Kainate excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures: Evidence for multiple apoptotic pathways. *Brain Research*, 916(1-2), 239-248.



- Liu, W., Liu, R., Schreiber, S. S., y Baudry, M. (2001). Role of polyamine metabolism in kainic acid excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neurochemistry*, 79(5), 976-984.
- Liu, X. Y., Li, C. Y., Bu, H., Li, Z., Li, B., Sun, M. M., et al. (2007). The neuroprotective potential of phase II enzyme inducer on motor neuron survival in traumatic spinal cord injury in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*,
- Liu-Snyder, P., Logan, M. P., Shi, R., Smith, D. T., y Borgens, R. B. (2007). Neuroprotection from secondary injury by polyethylene glycol requires its internalization. *Journal of Experimental Biology*, 210(Pt 8), 1455-1462.
- Llado, J., Haenggeli, C., Maragakis, N. J., Snyder, E. Y., y Rothstein, J. D. (2004). Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 27(3), 322-331.
- Lobner, D., y Lipton, P. (1990). Sigma-ligands and non-competitive NMDA antagonists inhibit glutamate release during cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*, 117(1-2), 169-174.
- Lockhart, B. P., Soulard, P., Benicourt, C., Privat, A., y Junien, J. L. (1995). Distinct neuroprotective profiles for sigma ligands against N-methyl-D-aspartate (NMDA), and hypoxia-mediated neurotoxicity in neuronal culture toxicity studies. *Brain Research*, 675(1-2), 110-120.
- Loh, K. P., Huang, S. H., De Silva, R., Tan, B. K., y Zhu, Y. Z. (2006). Oxidative stress: Apoptosis in neuronal injury. *Current Alzheimer Research*, 3(4), 327-337.
- LoPachin, R. M., y Lehning, E. J. (1997). Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143(2), 233-244.
- Lopez-Vales, R., Garcia-Alias, G., Fores, J., Udina, E., Gold, B. G., Navarro, X., et al. (2005). FK 506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat. *Journal of Neuroscience Research*, 81(6), 827-836.
- Lou, J., Lenke, L. G., Ludwig, F. J., y O'Brien, M. F. (1998). Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 36(10), 683-690.
- Louzada, P. R., Lima, A. C., Mendonca-Silva, D. L., Noel, F., De Mello, F. G., y Ferreira, S. T. (2004). Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and

- glutamate receptor agonists: Activation of GABA receptors and possible implications for alzheimer's disease and other neurological disorders. *FASEB Journal*, 18(3), 511-518.
- Lowry, K., Quach, H., Wreford, N., y Cheema, S. S. (2001). There is no loss of motor neurons in the rat spinal cord during postnatal maturation. *Journal of Anatomy*, 198(Pt 4), 473-479.
- Lu, D., Mahmood, A., Qu, C., Goussev, A., Schallert, T., y Chopp, M. (2005). Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 22(9), 1011-1017.
- Lu, J., Ashwell, K. W., y Waite, P. (2000). Advances in secondary spinal cord injury: Role of apoptosis. *Spine*, 25(14), 1859-1866.
- Lu, V. B., Moran, T. D., Balasubramanyan, S., Alier, K. A., Dryden, W. F., Colmers, W. F., et al. (2006). Substantia gelatinosa neurons in defined-medium organotypic slice culture are similar to those in acute slices from young adult rats. *Pain*, 121(3), 261-275.
- Lukacova, N., Halat, G., Chavko, M., y Marsala, J. (1996). Ischemia-reperfusion injury in the spinal cord of rabbits strongly enhances lipid peroxidation and modifies phospholipid profiles. *Neurochemical Research*, 21(8), 869-873.
- Luo, J., Borgens, R., y Shi, R. (2002). Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry*, 83(2), 471-480.
- Luo, J., Borgens, R., y Shi, R. (2004). Polyethylene glycol improves function and reduces oxidative stress in synaptosomal preparations following spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 21(8), 994-1007.
- Lyons, W. E., George, E. B., Dawson, T. M., Steiner, J. P., y Snyder, S. H. (1994). Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91(8), 3191-3195.
- Madsen, J. R., MacDonald, P., Irwin, N., Goldberg, D. E., Yao, G. L., Meiri, K. F., et al. (1998). Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*, 154(2), 673-683.

- Mahmoud, B. H., Hexsel, C. L., y Hamzavi, I. H. (2008). An update on new and emerging options for the treatment of vitiligo. *Skin Therapy Letter*, 13(2), 1-6.
- Majno, G., y Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. an overview of cell death. *American Journal of Pathology*, 146(1), 3-15.
- Malgouris, C., Bardot, F., Daniel, M., Pellis, F., Rataud, J., Uzan, A., et al. (1989). Riluzole, a novel antiglutamate, prevents memory loss and hippocampal neuronal damage in ischemic gerbils. *Journal of Neuroscience*, 9(11), 3720-3727.
- Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M., y Basu, J. (2005). Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39460-39467.
- Mandal, D., Moitra, P. K., Saha, S., y Basu, J. (2002). Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS Letters*, 513(2-3), 184-188.
- Mander, P., Borutaite, V., Moncada, S., y Brown, G. C. (2005). Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. *Journal of Neuroscience Research*, 79(1-2), 208-215.
- Manzerra, P., y Brown, I. R. (1992). Expression of heat shock genes (hsp70) in the rabbit spinal cord: Localization of constitutive and hyperthermia-inducible mRNA species. *Journal of Neuroscience Research*, 31(4), 606-615.
- Maragakis, N. J., Rao, M. S., Llado, J., Wong, V., Xue, H., Pardo, A., et al. (2005). Glial restricted precursors protect against chronic glutamate neurotoxicity of motor neurons in vitro. *Glia*, 50(2), 145-159.
- Marrazzo, A., Caraci, F., Salinaro, E. T., Su, T. P., Copani, A., y Ronsisvalle, G. (2005). Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against beta-amyloid-induced toxicity. *Neuroreport*, 16(11), 1223-1226.
- Massieu, L., y Tapia, R. (1994). 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline protects against both AMPA and kainate-induced lesions in rat striatum in vivo. *Neuroscience*, 59(4), 931-938.
- Masuda, S., Chikuma, M., y Sasaki, R. (1997). Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Research*, 746(1-2), 63-70.

- Matilla-Duenas, A., Goold, R., y Giunti, P. (2008). Clinical, genetic, molecular, and pathophysiological insights into spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum*.
- Matsuda, K., Fletcher, M., Kamiya, Y., y Yuzaki, M. (2003). Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *Journal of Neuroscience*, 23(31), 10064-10073.
- Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S., y Yuzaki, M. (2002). Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: A dominant subunit that reduces calcium permeability. *Molecular Brain Research*, 100(1-2), 43-52.
- Mattson, M. P. (1998). Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: Roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends in Neurosciences*, 21(2), 53-57.
- Mattson, M. P. (2003). Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: Abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Medicine*, 3(2), 65-94.
- Matute, C., Alberdi, E., Domerq, M., Pérez-Cerdá, F., Pérez-Sanmartín, A. y Sánchez-Gómez, M. V. (2001). The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends in Neuroscience*, 24(4), 224-230.
- Mautes, A. E., y Noble, L. J. (2000). Co-induction of HSP70 and heme oxygenase-1 in macrophages and glia after spinal cord contusion in the rat. *Brain Research*, 883(2), 233-237.
- McAdoo, D. J., Xu, G., Robak, G., Hughes, M. G., y Price, E. M. (2000). Evidence that reversed glutamate uptake contributes significantly to glutamate release following experimental injury to the rat spinal cord. *Brain Research*, 865(2), 283-285.
- McAdoo, D. J., Xu, G. Y., Robak, G., y Hughes, M. G. (1999). Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Experimental Neurology*, 159(2), 538-544.
- McCall, J. M., Braugher, J. M., y Hall, E. D. (1987). Lipid peroxidation and the role of oxygen radicals in CNS injury. *Acta Anaesthesiologica Belgica*, 38(4), 373-379.
- McCord, J. M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*, 312(3), 159-163.

- McCulloch, J. (1992). Excitatory amino acid antagonists and their potential for the treatment of ischaemic brain damage in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 34(2), 106-114.
- McDonald, J. W., Becker, D., Sadowsky, C. L., Jane JA, S., Conturo, T. E., y Schultz, L. M. (2002). Late recovery following spinal cord injury. case report and review of the literature. *Journal of Neurosurgery*, 97(2 Suppl), 252-265.
- McDonald, J. W., Stefovskaja, V. G., Liu, X. Z., Shin, H., Liu, S., y Choi, D. W. (2002). Neurotrophin potentiation of iron-induced spinal cord injury. *Neuroscience*, 115(3), 931-939.
- Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., et al. (1992). Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature*, 357(6373), 70-74.
- Meldrum, B. (1990). Protection against ischaemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*, 2(1), 27-57.
- Meldrum, B., y Garthwaite, J. (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11(9), 379-387.
- Mennini, T., De Paola, M., Bigini, P., Mastrotto, C., Fumagalli, E., Barbera, S., et al. (2006). Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo. *Molecular Medicine*, 12(7-8), 153-160.
- Meunier, J., Ieni, J., y Maurice, T. (2006). The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid beta25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 149(8), 998-1012.
- Miana-Mena, F. J., Munoz, M. J., Roux, S., Ciriza, J., Zaragoza, P., Brulet, P., et al. (2004). A non-viral vector for targeting gene therapy to motoneurons in the CNS. *Neuro-Degenerative Diseases*, 1(2-3), 101-108.
- Mills, C. D., Johnson, K. M., y Hulsebosch, C. E. (2002). Group I metabotropic glutamate receptors in spinal cord injury: Roles in neuroprotection and the development of chronic central pain. *Journal of Neurotrauma*, 19(1), 23-42.
- Mills, L. R., y Kater, S. B. (1990). Neuron-specific and state-specific differences in calcium homeostasis regulate the generation and degeneration of neuronal architecture. *Neuron*, 4(1), 149-163.

- Mirjany, M., Ho, L., y Pasinetti, G. M. (2002). Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(2), 494-500.
- Mitrasinovic, O. M., Grattan, A., Robinson, C. C., Lapustea, N. B., Poon, C., Ryan, H., et al. (2005). Microglia overexpressing the macrophage colony-stimulating factor receptor are neuroprotective in a microglial-hippocampal organotypic coculture system. *Journal of Neuroscience*, 25(17), 4442-4451.
- Monnet, F. P. (2005). Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca<sup>2+</sup>: Clinical and therapeutic relevance. *Biology of the Cell*, 97(12), 873-883.
- Monnet, F. P., Morin-Surun, M. P., Leger, J., y Combettes, L. (2003). Protein kinase C-dependent potentiation of intracellular calcium influx by sigma1 receptor agonists in rat hippocampal neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(2), 705-712.
- Montero, M., Poulsen, F. R., Noraberg, J., Kirkeby, A., van Beek, J., Leist, M., et al. (2007). Comparison of neuroprotective effects of erythropoietin (EPO) and carbamylerythropoietin (CEPO) against ischemia-like oxygen-glucose deprivation (OGD) and NMDA excitotoxicity in mouse hippocampal slice cultures. *Experimental Neurology*, 204(1), 106-117.
- Monyer, H., Hartley, D. M., y Choi, D. W. (1990). 21-aminosteroids attenuate excitotoxic neuronal injury in cortical cell cultures. *Neuron*, 5(2), 121-126.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., et al. (1992). Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 256(5060), 1217-1221.
- Mori, H., y Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, 34(10), 1219-1237.
- Morin-Surun, M. P., Collin, T., Denavit-Saubie, M., Baulieu, E. E., y Monnet, F. P. (1999). Intracellular sigma1 receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96(14), 8196-8199.
- Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y., y Sasaki, R. (1997). Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*, 76(1), 105-116.

- Mulholland, P. J., y Prendergast, M. A. (2003). Transection of intrinsic polysynaptic pathways reduces N-methyl-D-aspartate neurotoxicity in hippocampal slice cultures. *Neuroscience Research*, 46(3), 369-376.
- Munro, P., Kojima, H., Dupont, J. L., Bossu, J. L., Poulain, B., y Boquet, P. (2001). High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(2), 623-629.
- Nagai, A., Nakagawa, E., Choi, H. B., Hatori, K., Kobayashi, S., y Kim, S. U. (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(4), 386-392.
- Nakajima, H., Uchida, K., Kobayashi, S., Inukai, T., Horiuchi, Y., Yayama, T., et al. (2007). Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene. *Journal of Neurotrauma*, 24(4), 703-712.
- Nakamizo, T., Urushitani, M., Inoue, R., Shinohara, A., Sawada, H., Honda, K., et al. (2000). Protection of cultured spinal motor neurons by estradiol. *Neuroreport*, 11(16), 3493-3497.
- Nakanishi, S., y Masu, M. (1994). Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23, 319-348.
- Nakano, H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Piao, J. H., Xue, X., y Okumura, K. (2006). Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 730-737.
- Nakao, N. (1998). An increase in intracellular levels of cyclic AMP produces trophic effects on striatal neurons developing in culture. *Neuroscience*, 82(4), 1009-1020.
- Namiki, J., Kojima, A., y Tator, C. H. (2000). Effect of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 on functional recovery and regeneration after spinal cord injury in adult rats. *Journal of Neurotrauma*, 17(12), 1219-1231.

- Navarro, X., Udina, E., Ceballos, D., y Gold, B. G. (2001). Effects of FK506 on nerve regeneration and reinnervation after graft or tube repair of long nerve gaps. *Muscle and Nerve*, 24(7), 905-915.
- Nemecek, S. (1978). Morphological evidence of microcirculatory disturbances in experimental spinal cord trauma. *Advances in Neurology*, 20, 395-405.
- Neumann, S., Bradke, F., Tessier-Lavigne, M., y Basbaum, A. I. (2002). Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron*, 34(6), 885-893.
- Newcombe, J., Uddin, A., Dove, R., Patel, B., Turski, L., Nishizawa, Y. y Smith, T. (2008). Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol*, 18(1), 52-61.
- Nicholls, D., y Attwell, D. (1990). The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends in Pharmacological Sciences*, 11(11), 462-468.
- Nicolopoulos-Stournaras, S., y Iles, J. F. (1983). Motor neuron columns in the lumbar spinal cord of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 217(1), 75-85.
- Niemann, S., Kanki, H., Fukui, Y., Takao, K., Fukaya, M., Hynynen, M. N., et al. (2007). Genetic ablation of NMDA receptor subunit NR3B in mouse reveals motoneuronal and nonmotoneuronal phenotypes. *European Journal of Neuroscience*, 26(6), 1407-1420.
- Nikulina, E., Tidwell, J. L., Dai, H. N., Bregman, B. S., y Filbin, M. T. (2004). The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101(23), 8786-8790.
- Nishi, M., Hinds, H., Lu, H. P., Kawata, M., y Hayashi, Y. (2001). Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *Journal of Neuroscience*, 21(23), RC185.
- Nitecka, L., Tremblay, E., Charton, G., Bouillot, J. P., Berger, M. L., y Ben-Ari, Y. (1984). Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. histopathological sequelae. *Neuroscience*, 13(4), 1073-1094.
- Noda, M., Nakanishi, H., Nabekura, J. y Akaile, N. (2000). AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *Journal of Neuroscience*, 20(1), 251-258.



- Nogradi, A., Szabo, A., Pinter, S., y Vrbova, G. (2007). Delayed riluzole treatment is able to rescue injured rat spinal motoneurons. *Neuroscience*, 144(2), 431-438.
- Noh, K. M., Hwang, J. Y., Shin, H. C., y Koh, J. Y. (2000). A novel neuroprotective mechanism of riluzole: Direct inhibition of protein kinase C. *Neurobiology of Disease*, 7(4), 375-383.
- Nottingham, S., Knapp, P., y Springer, J. (2002). FK506 treatment inhibits caspase-3 activation and promotes oligodendroglial survival following traumatic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 177(1), 242-251.
- Novakova, M., Ela, C., Bowen, W. D., Hasin, Y., y Eilam, Y. (1998). Highly selective sigma receptor ligands elevate inositol 1,4,5-trisphosphate production in rat cardiac myocytes. *European Journal of Pharmacology*, 353(2-3), 315-327.
- Novelli, A., Reilly, J. A., Lysko, P. G., y Henneberry, R. C. (1988). Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Research*, 451(1-2), 205-212.
- Nuwayhid, S. J., y Werling, L. L. (2003). Sigma1 receptor agonist-mediated regulation of N-methyl-D-aspartate-stimulated [3H]dopamine release is dependent upon protein kinase C. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), 364-369.
- Okutan, O., Solaroglu, I., Beskonakli, E., y Taskin, Y. (2007). Recombinant human erythropoietin decreases myeloperoxidase and caspase-3 activity and improves early functional results after spinal cord injury in rats. *Journal of Clinical Neuroscience*, 14(4), 364-368.
- Olsson, Y., Sharma, H. S., Nyberg, F., y Westman, J. (1995). The opioid receptor antagonist naloxone influences the pathophysiology of spinal cord injury. *Progress in Brain Research*, 104, 381-399.
- Oppenheim, R. W. (1986). The absence of significant postnatal motoneuron death in the brachial and lumbar spinal cord of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 246(2), 281-286.
- Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., y Nicotera, P. (1989). Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Sciences*, 10(7), 281-285.
- Paes-de-Carvalho, R., Dias, B. V., Martins, R. A., Pereira, M. R., Portugal, C. C., y Lanfredi, C. (2005). Activation of glutamate receptors promotes a calcium-dependent and transporter-mediated release of purines in cultured avian retinal

- cells: Possible involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochemistry International*, 46(6), 441-451.
- Panter, S. S., Yum, S. W., y Faden, A. I. (1990). Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Annals of Neurology*, 27(1), 96-99.
- Park, E., Velumian, A. A., y Fehlings, M. G. (2004). The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: A review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *Journal of Neurotrauma*, 21(6), 754-774.
- Penas, C., Guzman, M. S., Verdu, E., Fores, J., Navarro, X., y Casas, C. (2007). Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response. *Journal of Neurochemistry*, 102(4), 1242-1255.
- Peng, G. S., Li, G., Tzeng, N. S., Chen, P. S., Chuang, D. M., Hsu, Y. D., et al. (2005). Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: Role of microglia. *Molecular Brain Research*, 134(1), 162-169.
- Perez-Leon, J., Frech, M. J., Schroder, J. E., Fischer, F., Kneussel, M., Wassle, H., et al. (2003). Spontaneous synaptic activity in an organotypic culture of the mouse retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(3), 1376-1387.
- Perez-Otano, I., Schulteis, C. T., Contractor, A., Lipton, S. A., Trimmer, J. S., Sucher, N. J., et al. (2001). Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *Journal of Neuroscience*, 21(4), 1228-1237.
- Peterson, E. R., Crain, S. M., y Murray, M. R. (1965). Differentiation and prolonged maintenance of bioelectrically active spinal cord cultures (rat, chick and human). *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 66(1), 130-154.
- Phelps, P. E., Rich, R., Dupuy-Davies, S., Rios, Y., y Wong, T. (2002). Evidence for a cell-specific action of reelin in the spinal cord. *Developmental Biology*, 244(1), 180-198.
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., y Klein, P. S. (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent

- anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36734-36741.
- Pietronigro, D. D., Hovsepian, M., Demopoulos, H. B., y Flamm, E. S. (1983). Loss of ascorbic acid from injured feline spinal cord. *Journal of Neurochemistry*, 41(4), 1072-1076.
- Pirondi, S., Fernandez, M., Schmidt, R., Hokfelt, T., Giardino, L., y Calza, L. (2005). The galanin-R2 agonist AR-M1896 reduces glutamate toxicity in primary neural hippocampal cells. *Journal of Neurochemistry*, 95(3), 821-833.
- Pitts, L. H., Ross, A., Chase, G. A., y Faden, A. I. (1995). Treatment with thyrotropin-releasing hormone (TRH) in patients with traumatic spinal cord injuries. *Journal of Neurotrauma*, 12(3), 235-243.
- Pointillart, V., Petitjean, M. E., Wiart, L., Vital, J. M., Lassie, P., Thicoipe, M., et al. (2000). Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. *Spinal Cord*, 38(2), 71-76.
- Popoli, P., Pepponi, R., Martire, A., Armida, M., Pezzola, A., Galluzzo, M., et al. (2007). Neuroprotective effects of thymosin beta4 in experimental models of excitotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1112, 219-224.
- Pratt, J., Rataud, J., Bardot, F., Roux, M., Blanchard, J. C., Laduron, P. M., et al. (1992). Neuroprotective actions of riluzole in rodent models of global and focal cerebral ischaemia. *Neuroscience Letters*, 140(2), 225-230.
- Price, R. D., Yamaji, T., y Matsuoka, N. (2003). FK506 potentiates NGF-induced neurite outgrowth via the Ras/Raf/MAP kinase pathway. *British Journal of Pharmacology*, 140(5), 825-829.
- Prithviraj, R., y Inglis, F. M. (2008). Expression of the N-methyl-d-aspartate receptor subunit NR3B regulates dendrite morphogenesis in spinal motor neurons. *Neuroscience*,
- Qiu, J., Cai, D., Dai, H., McAtee, M., Hoffman, P. N., Bregman, B. S., et al. (2002). Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron*, 34(6), 895-903.
- Quirion, R., Bowen, W. D., Itzhak, Y., Junien, J. L., Musacchio, J. M., Rothman, R. B., et al. (1992). A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13(3), 85-86.

- Quivy, V., y Van Lint, C. (2004). Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1221-1229.
- Rakowicz, W. P., Staples, C. S., Milbrandt, J., Brunstrom, J. E., y Johnson, E. M., Jr. (2002). Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival of early postnatal spinal motor neurons in the lateral and medial motor columns in slice culture. *Journal of Neuroscience*, 22(10), 3953-3962.
- Rao, S. D., Yin, H. Z., y Weiss, J. H. (2003). Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(7), 2627-2633.
- Rattray, M., y Bendotti, C. (2006). Does excitotoxic cell death of motor neurons in ALS arise from glutamate transporter and glutamate receptor abnormalities? *Experimental Neurology*, 201(1), 15-23.
- Ray, S. K., Hogan, E. L., y Banik, N. L. (2003). Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: Neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Research Reviews*, 42(2), 169-185.
- Regan, R. F. (1996). The vulnerability of spinal cord neurons to excitotoxic injury: Comparison with cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 213(1), 9-12.
- Regan, R. F., y Choi, D. W. (1991). Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell culture. *Neuroscience*, 43(2-3), 585-591.
- Ren, M., Leng, Y., Jeong, M., Leeds, P. R., y Chuang, D. M. (2004). Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: Potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *Journal of Neurochemistry*, 89(6), 1358-1367.
- Riepe, M. W., Hori, N., Ludolph, A. C., y Carpenter, D. O. (1995). Failure of neuronal ion exchange, not potentiated excitation, causes excitotoxicity after inhibition of oxidative phosphorylation. *Neuroscience*, 64(1), 91-97.
- Rivlin, A. S., y Tator, C. H. (1978). Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *Journal of Neurosurgery*, 49(6), 844-853.
- Roettger, V., y Lipton, P. (1996). Mechanism of glutamate release from rat hippocampal slices during in vitro ischemia. *Neuroscience*, 75(3), 677-685.
- Rootman, D. S., Tatton, W. G., y Hay, M. (1981). Postnatal histogenetic death of rat forelimb motoneurons. *Journal of Comparative Neurology*, 199(1), 17-27.

- Rosen, D. R., Sapp, P., O'Regan, J., McKenna-Yasek, D., Schlumpf, K. S., Haines, J. L., et al. (1994). Genetic linkage analysis of familial amyotrophic lateral sclerosis using human chromosome 21 microsatellite DNA markers. *American Journal of Medical Genetics*, 51(1), 61-69.
- Rosenberg, L. J., Teng, Y. D., y Wrathall, J. R. (1999). Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin on acute white matter pathology after experimental contusive spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 19(14), 6122-6133.
- Rosner, H., y Vacun, G. (1997). Organotypic spinal cord culture in serum-free fibrin gel: A new approach to study three-dimensional neurite outgrowth and of neurotoxicity testing: Effects of modulating the actin and tubulin dynamics and protein kinase activities. *Journal of Neuroscience Methods*, 78(1-2), 93-103.
- Ross, C. A., y Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10 Suppl, S10-7.
- Ross, I. B., y Tator, C. H. (1991). Further studies of nimodipine in experimental spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*, 8(4), 229-238.
- Rossi, A. G., Sawatzky, D. A., Walker, A., Ward, C., Sheldrake, T. A., Riley, N. A., et al. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nature Medicine*, 12(9), 1056-1064.
- Rossignol, S., Bouyer, L., Langlet, C., Barthelemy, D., Chau, C., Giroux, N., et al. (2004). Determinants of locomotor recovery after spinal injury in the cat. *Progress in Brain Research*, 143, 163-172.
- Rothman, S. M. (1985). The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *Journal of Neuroscience*, 5(6), 1483-1489.
- Rothstein, J. D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., y Kuncl, R. W. (1993). Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90(14), 6591-6595.
- Rothstein, J. D., y Kuncl, R. W. (1995). Neuroprotective strategies in a model of chronic glutamate-mediated motor neuron toxicity. *Journal of Neurochemistry*, 65(2), 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. *New England Journal of Medicine*, 326(22), 1464-1468.
- 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. *Annals of Neurology*, 38(1), 73-84.
- Rouaux, C., Panteleeva, I., Rene, F., Gonzalez de Aguilar, J. L., Echaniz-Laguna, A., Dupuis, L., et al. (2007). Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Journal of Neuroscience* :, 27(21), 5535-5545.
- Roux, S., Saint Cloment, C., Curie, T., Girard, E., Mena, F. J., Barbier, J., et al. (2006). Brain-derived neurotrophic factor facilitates in vivo internalization of tetanus neurotoxin C-terminal fragment fusion proteins in mature mouse motor nerve terminals. *European Journal of Neuroscience*, 24(6), 1546-1554.
- Ruan, B., Pong, K., Jow, F., Bowlby, M., Crozier, R. A., Liu, D., et al. (2008). Binding of rapamycin analogs to calcium channels and FKBP52 contributes to their neuroprotective activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(1), 33-38.
- Rupinder, S. K., Gurpreet, A. K., y Manjeet, S. (2007). Cell suicide and caspases. *Vascular Pharmacology*, 46(6), 383-393.
- Ruscher, K., Rzczinski, S., Thein, E., Freyer, D., Victorov, I. V., Lam, T. T., et al. (2007). Neuroprotective effects of the beta-carboline abecarnil studied in cultured cortical neurons and organotypic retinal cultures. *Neuropharmacology*, 52(7), 1488-1495.
- Ryu, H., Smith, K., Camelo, S. I., Carreras, I., Lee, J., Iglesias, A. H., et al. (2005). Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neurochemistry*, 93(5), 1087-1098.
- Rzczinski, S., Victorov, I. V., Lyjin, A. A., Aleksandrova, O. P., Harms, C., Kronenberg, G., et al. (2006). Roller culture of free-floating retinal slices: A new system of organotypic cultures of adult rat retina. *Ophthalmic Research*, 38(5), 263-269.

- Sabel, B. A., Slavin, M. D., y Stein, D. G. (1984). GM1 ganglioside treatment facilitates behavioral recovery from bilateral brain damage. *Science*, 225(4659), 340-342.
- Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S., et al. (1998). Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(1), 26-32.
- Saito, K., Markey, S. P., y Heyes, M. P. (1992). Effects of immune activation on quinolinic acid and neuroactive kynurenines in the mouse. *Neuroscience*, 51(1), 25-39.
- Sakai, T., Yoshitoshi, T., Nagai, Y., y Kitahara, K. (2006). Increased glutamate uptake and GLAST expression by cyclic AMP in retinal glial cells. *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 244(3), 359-363.
- Salinska, E., Danysz, W., y Lazarewicz, J. W. (2005). The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathologica*, 43(4), 322-339.
- Samdani, A. F., Dawson, T. M., y Dawson, V. L. (1997). Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*, 28(6), 1283-1288.
- Sandler, A. N., y Tator, C. H. (1976). Effect of acute spinal cord compression injury on regional spinal cord blood flow in primates. *Journal of Neurosurgery*, 45(6), 660-676.
- Santos, A. E., Carvalho, A. L., Lopes, M. C., y Carvalho, A. P. (2001). Differential postreceptor signaling events triggered by excitotoxic stimulation of different ionotropic glutamate receptors in retinal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 66(4), 643-655.
- Sasaki, R., Masuda, S., y Nagao, M. (2000). Erythropoietin: Multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(9), 1775-1793.
- Sasaki, T., Hamada, J., Shibata, M., Gotoh, J., Araki, N., y Fukuuchi, Y. (2004). FK506 abrogates delayed neuronal death via suppression of nitric oxide production in rats. *Brain Research*, 1009(1-2), 34-39.
- Sasaki, T., Kitagawa, K., Omura-Matsuoka, E., Todo, K., Terasaki, Y., Sugiura, S., et al. (2007). The phosphodiesterase inhibitor rolipram promotes survival of newborn hippocampal neurons after ischemia. *Stroke*, 38(5), 1597-1605.

- Sattler, R., y Tymianski, M. (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *Journal of Molecular Medicine*, 78(1), 3-13.
- Saunders, R. D., Dugan, L. L., Demediuk, P., Means, E. D., Horrocks, L. A., y Anderson, D. K. (1987). Effects of methylprednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *Journal of Neurochemistry*, 49(1), 24-31.
- Scarlsbrick, I. A., Haase, P., y Hryciyshyn, A. W. (1990). The arrangement of forearm motoneurons in young and adult rats and the possibility of naturally occurring motoneuron death. *Journal of Anatomy*, 171, 57-67.
- Schetz, J. A., Perez, E., Liu, R., Chen, S., Lee, I., y Simpkins, J. W. (2007). A prototypical sigma-1 receptor antagonist protects against brain ischemia. *Brain Research*, 1181, 1-9.
- Schubert, D., y Piasecki, D. (2001). Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *Journal of Neuroscience*, 21(19), 7455-7462.
- Schumacher, P. A., Eubanks, J. H., y Fehlings, M. G. (1999). Increased calpain I-mediated proteolysis, and preferential loss of dephosphorylated NF200, following traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 91(2), 733-744.
- 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. *Journal of Neurochemistry*, 74(4), 1646-1655.
- Schwab, J. M., Brechtel, K., Mueller, C. A., Failli, V., Kaps, H. P., Tuli, S. K., et al. (2006). Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective. *Progress in Neurobiology*, 78(2), 91-116.
- Schwartz, E. D., Cooper, E. T., Chin, C. L., Wehrli, S., Tessler, A., y Hackney, D. B. (2005). Ex vivo evaluation of ADC values within spinal cord white matter tracts. *American Journal of Neuroradiology*, 26(2), 390-397.
- Schwartz, G., y Fehlings, M. G. (2001). Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: Improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *Journal of Neurosurgery*, 94(2 Suppl), 245-256.



- Schwartz, M., Shaked, I., Fisher, J., Mizrahi, T., y Schori, H. (2003). Protective autoimmunity against the enemy within: Fighting glutamate toxicity. *Trends in Neurosciences*, 26(6), 297-302.
- Scurlock, B., y Dawson, G. (1999). Differential responses of oligodendrocytes to tumor necrosis factor and other pro-apoptotic agents: Role of ceramide in apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*, 55(4), 514-522.
- Seidl, E. C. (1999). Promising pharmacological agents in the management of acute spinal cord injury. *Critical Care Nursing Quarterly*, 22(2), 44-50.
- Sekhon, L. H., y Fehlings, M. G. (2001). Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, 26(24 Suppl), S2-12.
- Sen, I., Joshi, D. C., Joshi, P. G., y Joshi, N. B. (2008). NMDA and non-NMDA receptor-mediated differential Ca<sup>2+</sup> load and greater vulnerability of motor neurons in spinal cord cultures. *Neurochemistry International*, 52(1-2), 247-255.
- Senda, T., Mita, S., Kaneda, K., Kikuchi, M., y Akaike, A. (1998). Effect of SA4503, a novel sigma1 receptor agonist, against glutamate neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. *European Journal of Pharmacology*, 342(1), 105-111.
- Sendtner, M., Holtmann, B., y Hughes, R. A. (1996). The response of motoneurons to neurotrophins. *Neurochemical Research*, 21(7), 831-841.
- Senter, H. J., y Venes, J. L. (1978). Altered blood flow and secondary injury in experimental spinal cord trauma. *Journal of Neurosurgery*, 49(4), 569-578.
- Sharma, H. S. (2006). Post-traumatic application of brain-derived neurotrophic factor and glia-derived neurotrophic factor on the rat spinal cord enhances neuroprotection and improves motor function. *Acta Neurochirurgica, Supplement*, 96, 329-334.
- Sharma, H. S. (2007). A select combination of neurotrophins enhances neuroprotection and functional recovery following spinal cord injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1122, 95-111.
- Shen, Y. C., Wang, Y. H., Chou, Y. C., Liou, K. T., Yen, J. C., Wang, W. Y., et al. (2008). Dimemorfan protects rats against ischemic stroke through activation of sigma-1 receptor-mediated mechanisms by decreasing glutamate accumulation. *Journal of Neurochemistry*, 104(2), 558-572.

- Shichinohe, H., Kuroda, S., Abumiya, T., Ikeda, J., Kobayashi, T., Yoshimoto, T., et al. (2004). FK506 reduces infarct volume due to permanent focal cerebral ischemia by maintaining BAD turnover and inhibiting cytochrome c release. *Brain Research*, 1001(1-2), 51-59.
- Shih, Y. H., Chein, Y. C., Wang, J. Y., y Fu, Y. S. (2004). Ursolic acid protects hippocampal neurons against kainate-induced excitotoxicity in rats. *Neuroscience Letters*, 362(2), 136-140.
- Shingo, T., Sorokan, S. T., Shimazaki, T., y Weiss, S. (2001). Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, 21(24), 9733-9743.
- Silva, A. P., Pinheiro, P. S., Carvalho, A. P., Carvalho, C. M., Jakobsen, B., Zimmer, J., et al. (2003). Activation of neuropeptide Y receptors is neuroprotective against excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *FASEB Journal*, 17(9), 1118-1120.
- Siman, R., Noszek, J. C., y Kegerise, C. (1989). Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *Journal of Neuroscience*, 9(5), 1579-1590.
- Simpkins, K. L., Guttman, R. P., Dong, Y., Chen, Z., Sokol, S., Neumar, R. W., et al. (2003). Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *Journal of Neuroscience*, 23(36), 11322-11331.
- Singleton, R. H., Stone, J. R., Okonkwo, D. O., Pellicane, A. J., y Povlishock, J. T. (2001). The immunophilin ligand FK506 attenuates axonal injury in an impact-acceleration model of traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 18(6), 607-614.
- Skene, J. H. (1989). Axonal growth-associated proteins. *Annual Review of Neuroscience*, 12, 127-156.
- Sommer, N., Martin, R., McFarland, H. F., Quigley, L., Cannella, B., Raine, C. S., et al. (1997). Therapeutic potential of phosphodiesterase type 4 inhibition in chronic autoimmune demyelinating disease. *Journal of Neuroimmunology*, 79(1), 54-61.
- Sonmez, A., Kabakci, B., Vardar, E., Gurel, D., Sonmez, U., Orhan, Y. T., et al. (2007). Erythropoietin attenuates neuronal injury and potentiates the expression

- of pCREB in anterior horn after transient spinal cord ischemia in rats. *Surgical Neurology*, 68(3), 297-303.
- Springer, J. E., Azbill, R. D., y Knapp, P. E. (1999). Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nature Medicine*, 5(8), 943-946.
- Springer, J. E., Azbill, R. D., Nottingham, S. A., y Kennedy, S. E. (2000). Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 20(19), 7246-7251.
- Sribnick, E. A., Matzelle, D. D., Banik, N. L., y Ray, S. K. (2007). Direct evidence for calpain involvement in apoptotic death of neurons in spinal cord injury in rats and neuroprotection with calpain inhibitor. *Neurochemical Research*, 32(12), 2210-2216.
- Stavridis, S. I., Dehghani, F., Korf, H. W., y Hailer, N. P. (2005). Characterisation of transverse slice culture preparations of postnatal rat spinal cord: Preservation of defined neuronal populations. *Histochemistry and Cell Biology*, 123(4-5), 377-392.
- Steiner, J. P., Connolly, M. A., Valentine, H. L., Hamilton, G. S., Dawson, T. M., Hester, L., et al. (1997). Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nature Medicine*, 3(4), 421-428.
- Stewart, G. R., Olney, J. W., Pathikonda, M., y Snider, W. D. (1991). Excitotoxicity in the embryonic chick spinal cord. *Annals of Neurology*, 30(6), 758-766.
- Stewart, W. B., y Wagner, F. C. (1979). Vascular permeability changes in the contused feline spinal cord. *Brain Research*, 169(1), 163-167.
- Stirling, D. P., Khodarahmi, K., Liu, J., McPhail, L. T., McBride, C. B., Steeves, J. D., et al. (2004). Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 24(9), 2182-2190.
- Stoppini, L., Buchs, P. A., y Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173-182.
- Stys, P. K. (2005). General mechanisms of axonal damage and its prevention. *Journal of the Neurological Sciences*, 233(1-2), 3-13.

- Stys, P. K., Waxman, S. G., y Ransom, B. R. (1992). Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: Role of  $\text{Na}^+$  channels and  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Journal of Neuroscience*, 12(2), 430-439.
- Su, T. P., Wu, X. Z., Cone, E. J., Shukla, K., Gund, T. M., Dodge, A. L., et al. (1991). Sigma compounds derived from phencyclidine: Identification of PRE-084, a new, selective sigma ligand. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259(2), 543-550.
- Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., et al. (1995). Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *Journal of Neuroscience*, 15(10), 6509-6520.
- Sugai, F., Yamamoto, Y., Miyaguchi, K., Zhou, Z., Sumi, H., Hamasaki, T., et al. (2004). Benefit of valproic acid in suppressing disease progression of ALS model mice. *European Journal of Neuroscience*, 20(11), 3179-3183.
- Sugawa, M., Sakurai, Y., Ishikawa-Ieda, Y., Suzuki, H., y Asou, H. (2002). Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neuroscience Research*, 44(4), 391-403.
- Sulaiman, O. A., Voda, J., Gold, B. G., y Gordon, T. (2002). FK506 increases peripheral nerve regeneration after chronic axotomy but not after chronic schwann cell denervation. *Experimental Neurology*, 175(1), 127-137.
- Sureda, F. X., Gabriel, C., Pubill, D., Pallas, M., Escubedo, E., Camarasa, J., et al. (1999). Effects of U-83836E on glutamate-induced neurotoxicity in dissociated rat cerebellar granule cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156(1), 1-5.
- Suvarna, N. U., y O'Donnell, J. M. (2002). Hydrolysis of N-methyl-D-aspartate receptor-stimulated cAMP and cGMP by PDE4 and PDE2 phosphodiesterases in primary neuronal cultures of rat cerebral cortex and hippocampus. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(1), 249-256.
- Taguchi, R., Shirakawa, H., Yamaguchi, T., Kume, T., Katsuki, H., y Akaike, A. (2006). Nitric oxide-mediated effect of nipradilol, an alpha- and beta-adrenergic blocker, on glutamate neurotoxicity in rat cortical cultures. *European Journal of Pharmacology*, 535(1-3), 86-94.
- Tai, M. H., Cheng, H., Wu, J. P., Liu, Y. L., Lin, P. R., Kuo, J. S., et al. (2003). Gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor promotes functional

- recovery following spinal cord contusion. *Experimental Neurology*, 183(2), 508-515.
- Takebayashi, M., Hayashi, T., y Su, T. P. (2002). Nerve growth factor-induced neurite sprouting in PC12 cells involves sigma-1 receptors: Implications for antidepressants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(3), 1227-1237.
- Takebayashi, M., Hayashi, T., y Su, T. P. (2004). A perspective on the new mechanism of antidepressants: Neuritogenesis through sigma-1 receptors. *Pharmacopsychiatry*, 37 Suppl 3, S208-13.
- Taoka, Y., Okajima, K., Uchiba, M., y Johno, M. (2001). Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *Journal of Neurotrauma*, 18(5), 533-543.
- Tator, C. H. (1991). Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neuro-Chirurgie*, 37(5), 291-302.
- Tator, C. H., y Fehlings, M. G. (1991). Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of Neurosurgery*, 75(1), 15-26.
- Tator, C. H., y Koyanagi, I. (1997). Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, 86(3), 483-492.
- Tchedre, K. T., y Yorio, T. (2008). Sigma-1 receptors protect RGC-5 cells from apoptosis by regulating intracellular calcium, bax levels, and caspase-3 activation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(6), 2577-2588.
- Teng, Y. D., Choi, H., Onario, R. C., Zhu, S., Desilets, F. C., Lan, S., et al. (2004). Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101(9), 3071-3076.
- Teng, Y. D., Mocchetti, I., Taveira-DaSilva, A. M., Gillis, R. A., y Wrathall, J. R. (1999). Basic fibroblast growth factor increases long-term survival of spinal motor neurons and improves respiratory function after experimental spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 19(16), 7037-7047.
- Teng, Y. D., y Wrathall, J. R. (1997). Local blockade of sodium channels by tetrodotoxin ameliorates tissue loss and long-term functional deficits resulting

- from experimental spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 17(11), 4359-4366.
- Thomas, A. J., Nockels, R. P., Pan, H. Q., Shaffrey, C. I., y Chopp, M. (1999). Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine*, 24(20), 2134-2138.
- Thompson, S. A., Smith, O., Linn, D. M., y Linn, C. L. (2006). Acetylcholine neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity in adult pig retinal ganglion cells is partially mediated through alpha4 nAChRs. *Experimental Eye Research*, 83(5), 1135-1145.
- Tikka, T. M., y Koistinaho, J. E. (2001). Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *Journal of Immunology*, 166(12), 7527-7533.
- Tikka, T. M., Vartiainen, N. E., Goldsteins, G., Oja, S. S., Andersen, P. M., Marklund, S. L., et al. (2002). Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. *Brain*, 125(Pt 4), 722-731.
- Toborek, M., Malecki, A., Garrido, R., Mattson, M. P., Hennig, B., y Young, B. (1999). Arachidonic acid-induced oxidative injury to cultured spinal cord neurons. *Journal of Neurochemistry*, 73(2), 684-692.
- Tolosa, L., Mir, M., Asensio, V. J., Olmos, G., y Llado, J. (2008). Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Neurochemistry*, 105(4), 1080-1090.
- Tovar-Y-Romo, L. B., Zepeda, A., y Tapia, R. (2007). Vascular endothelial growth factor prevents paralysis and motoneuron death in a rat model of excitotoxic spinal cord neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(10), 913-922.
- Tracey, D. (1985). Ascending and descending pathways in the spinal cord. In G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (pp. 311). Australia: Academic Press Australia.
- Tsai, L. K., Tsai, M. S., Ting, C. H., y Li, H. (2008). Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *Journal of Molecular Medicine*,

- Tu, P. H., Raju, P., Robinson, K. A., Gurney, M. E., Trojanowski, J. Q., y Lee, V. M. (1996). Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93(7), 3155-3160.
- Udina, E., Ceballos, D., Verdu, E., Gold, B. G., y Navarro, X. (2002). Bimodal dose-dependence of FK506 on the rate of axonal regeneration in mouse peripheral nerve. *Muscle and Nerve*, 26(3), 348-355.
- Udina, E., y Navarro, X. (2002). Immunophilins: Neuroprotective agents and promoters of neural regeneration. [Las inmunofilinas: agentes neuroprotectores y promotores de la regeneración neural] *Neurologia*, 17(4), 200-213.
- Udina, E., Rodriguez, F. J., Verdu, E., Espejo, M., Gold, B. G., y Navarro, X. (2004). FK506 enhances regeneration of axons across long peripheral nerve gaps repaired with collagen guides seeded with allogeneic schwann cells. *Glia*, 47(2), 120-129.
- Unalp, A., Dirik, E., y Kurul, S. (2008). Factor VII deficiency associated with valproate treatment. *Pediatrics International*, 50(3), 403-405.
- Urushitani, M., Nakamizo, T., Inoue, R., Sawada, H., Kihara, T., Honda, K., et al. (2001). N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload in acute excitotoxic motor neuron death: A mechanism distinct from chronic neurotoxicity after  $Ca^{2+}$  influx. *Journal of Neuroscience Research*, 63(5), 377-387.
- Urushitani, M., Shimohama, S., Kihara, T., Sawada, H., Akaike, A., Ibi, M., et al. (1998). Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: Involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. *Annals of Neurology*, 44(5), 796-807.
- Vagnerova, K., Hurn, P. D., Bhardwaj, A., y Kirsch, J. R. (2006). Sigma 1 receptor agonists act as neuroprotective drugs through inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Anesthesia and Analgesia*, 103(2), 430-434.
- 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. *Journal of Neuroscience*, 20(19), 7158-7166.

- Vandenbergh, W., Van Den Bosch, L., y Robberecht, W. (1998). Glial cells potentiate kainate-induced neuronal death in a motoneuron-enriched spinal coculture system. *Brain Research*, 807(1-2), 1-10.
- Vargas, M. R., Pehar, M., Cassina, P., Beckman, J. S., y Barbeito, L. (2006). Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 97(3), 687-696.
- Villa, P., Bigini, P., Mennini, T., Agnello, D., Laragione, T., Cagnotto, A., et al. (2003). Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 198(6), 971-975.
- Vitellaro-Zuccarello, L., Mazzetti, S., Madaschi, L., Bosisio, P., Gorio, A., y De Biasi, S. (2007). Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience*, 144(3), 865-877.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Corsini, E., Villa, P., Ghezzi, P., Garau, A., et al. (2005). Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neurochemistry*, 93(2), 412-421.
- Voda, J., Yamaji, T., y Gold, B. G. (2005). Neuroimmunophilin ligands improve functional recovery and increase axonal growth after spinal cord hemisection in rats. *Journal of Neurotrauma*, 22(10), 1150-1161.
- Vornov, J. J., Tasker, R. C., y Coyle, J. T. (1991). Direct observation of the agonist-specific regional vulnerability to glutamate, NMDA, and kainate neurotoxicity in organotypic hippocampal cultures. *Experimental Neurology*, 114(1), 11-22.
- Wallace, M. C., Tator, C. H., y Frazee, P. (1986). Relationship between posttraumatic ischemia and hemorrhage in the injured rat spinal cord as shown by colloidal carbon angiography. *Neurosurgery*, 18(4), 433-439.
- Wang, H., Gong, B., Vadakkan, K. I., Toyoda, H., Kaang, B. K., y Zhuo, M. (2007). Genetic evidence for adenylyl cyclase 1 as a target for preventing neuronal excitotoxicity mediated by N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1507-1517.
- Wang, M. S., Zeleny-Pooley, M., y Gold, B. G. (1997). Comparative dose-dependence study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration



- in the rat sciatic nerve. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282(2), 1084-1093.
- Wang, S. J., Wang, K. Y., y Wang, W. C. (2004). Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience*, 125(1), 191-201.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., y Mishina, M. (1992). Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport*, 3(12), 1138-1140.
- Watkins, J. C., y Evans, R. H. (1981). Excitatory amino acid transmitters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 21, 165-204.
- Weller, U., Taylor, C. F., y Habermann, E. (1986). Quantitative comparison between tetanus toxin, some fragments and toxoid for binding and axonal transport in the rat. *Toxicon*, 24(11-12), 1055-1063.
- Wells, J. E., Hurlbert, R. J., Fehlings, M. G., y Yong, V. W. (2003). Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain*, 126(Pt 7), 1628-1637.
- Wen, T. C., Sadamoto, Y., Tanaka, J., Zhu, P. X., Nakata, K., Ma, Y. J., et al. (2002). Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating bcl-xL expression. *Journal of Neuroscience Research*, 67(6), 795-803.
- Wetts, R., y Vaughn, J. E. (1998). Differences in developmental cell death between somatic and autonomic motor neurons of rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 396(4), 483-492.
- Whetsell, W. O., Jr, Allen, G. S., y Tulipan, N. B. (1989). Alteration of kainic acid and quinolinic acid toxicity by neostriatal transplants in vitro. *Neuroscience Letters*, 96(1), 18-22.
- Whetsell, W. O., Jr, y Schwarcz, R. (1983). The organotypic tissue culture model of corticostriatal system used for examining amino acid neurotoxicity and its antagonism: Studies on kainic acid, quinolinic acid and (-) 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. *Journal of Neural Transmission, Supplementum*, 19, 53-63.

- Whetsell, W. O., Jr, y Schwarcz, R. (1989). Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system. *Neuroscience Letters*, 97(3), 271-275.
- Whitaker, C. M., Beaumont, E., Wells, M. J., Magnuson, D. S., Hetman, M., y Onifer, S. M. (2008). Rolipram attenuates acute oligodendrocyte death in the adult rat ventrolateral funiculus following contusive cervical spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, 438(2), 200-204.
- Widenfalk, J., Lipson, A., Jubran, M., Hofstetter, C., Ebendal, T., Cao, Y., et al. (2003). Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury. *Neuroscience*, 120(4), 951-960.
- Wiessner, C., Allegrini, P. R., Ekatothramis, D., Jewell, U. R., Stallmach, T., y Gassmann, M. (2001). Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(7), 857-864.
- Williams, R. S., Cheng, L., Mudge, A. W., y Harwood, A. J. (2002). A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*, 417(6886), 292-295.
- 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. *Annals of Neurology*, 42(2), 200-207.
- Wojda, U., Salinska, E., y Kuznicki, J. (2008). Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*,
- Won, Y. J., Yoo, J. Y., Lee, J. H., Hwang, S. J., Kim, D., y Hong, H. N. (2007). Erythropoietin is neuroprotective on GABAergic neurons against kainic acid-excitotoxicity in the rat spinal cell cultures. *Brain Research*, 1154, 31-39.
- Wrathall, J. R., Teng, Y. D., y Marriott, R. (1997). Delayed antagonism of AMPA/kainate receptors reduces long-term functional deficits resulting from spinal cord trauma. *Experimental Neurology*, 145(2 Pt 1), 565-573.
- Wu, G. J., Chen, W. F., Sung, C. S., Jean, Y. H., Shih, C. M., Shyu, C. Y., et al. (2007). Preventive effects of intrathecal methylprednisolone administration on

- spinal cord ischemia in rats: The role of excitatory amino acid metabolizing systems. *Neuroscience*, 147(2), 294-303.
- Wu, X., Chen, P. S., Dallas, S., Wilson, B., Block, M. L., Wang, C. C., et al. (2008). Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, , 1-12.
- Xapelli, S., Bernardino, L., Ferreira, R., Grade, S., Silva, A. P., Salgado, J. R., et al. (2008). Interaction between neuropeptide Y (NPY) and brain-derived neurotrophic factor in NPY-mediated neuroprotection against excitotoxicity: A role for microglia. *European Journal of Neuroscience*, 27(8), 2089-2102.
- Xu, G. Y., McAdoo, D. J., Hughes, M. G., Robak, G., y de Castro, R., Jr. (1998a). Considerations in the determination by microdialysis of resting extracellular amino acid concentrations and release upon spinal cord injury. *Neuroscience*, 86(3), 1011-1021.
- Xu, J., Fan, G., Chen, S., Wu, Y., Xu, X. M., y Hsu, C. Y. (1998b). Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. *Molecular Brain Research*, 59(2), 135-142.
- Xu, J., Qu, Z. X., Hogan, E. L., y Perot, P. L., Jr. (1992). Protective effect of methylprednisolone on vascular injury in rat spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 9(3), 245-253.
- Xu, W., Wong, T. P., Chery, N., Gaertner, T., Wang, Y. T., y Baudry, M. (2007). Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: A key step in excitotoxicity. *Neuron*, 53(3), 399-412.
- Yang, S., Bhardwaj, A., Cheng, J., Alkayed, N. J., Hum, P. D., y Kirsch, J. R. (2007). Sigma receptor agonists provide neuroprotection in vitro by preserving bcl-2. *Anesthesia and Analgesia*, 104(5), 1179-1184.
- Yatsiv, I., Grigoriadis, N., Simeonidou, C., Stahel, P. F., Schmidt, O. I., Alexandrovitch, A. G., et al. (2005). Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB Journal*, 19(12), 1701-1703.

- Yi, J. H., y Hazell, A. S. (2006). Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochemistry International*, 48(5), 394-403.
- Yoo, J. Y., Won, Y. J., Lee, J. H., Kim, J. U., Sung, I. Y., Hwang, S. J., et al. (2008). Neuroprotective effects of erythropoietin posttreatment against kainate-induced excitotoxicity in mixed spinal cultures. *Journal of Neuroscience Research*,
- Yoshioka, A., Yamaya, Y., Saiki, S., Kanemoto, M., Hirose, G., y Pleasure, D. (2000). Cyclic GMP/cyclic GMP-dependent protein kinase system prevents excitotoxicity in an immortalized oligodendroglial cell line. *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 633-640.
- Yoshioka, A., Bacskai, B. y Pleasure, D. (1996). Pathophysiology of oligodendroglial excitotoxicity. *Journal of Neuroscience Research*, 46(4), 427-437.
- Young, W., y Koreh, I. (1986). Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Research*, 365(1), 42-53.
- Yu, X., Sun, L., Luo, X., Xu, Z., y An, L. (2003). Investigation of the neuronal death mode induced by glutamate treatment in serum-, antioxidant-free primary cultured cortical neurons. *Developmental Brain Research*, 145(2), 263-268.
- Yu, Y., Matsuyama, Y., Nakashima, S., Yanase, M., Kiuchi, K., y Ishiguro, N. (2004). Effects of MPSS and a potent iNOS inhibitor on traumatic spinal cord injury. *Neuroreport*, 15(13), 2103-2107.
- Yuan, J., y Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407(6805), 802-809.
- Yuan, P. X., Huang, L. D., Jiang, Y. M., Gutkind, J. S., Manji, H. K., y Chen, G. (2001). The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31674-31683.
- Zang, D. W., y Cheema, S. S. (2003). Leukemia inhibitory factor promotes recovery of locomotor function following spinal cord injury in the mouse. *Journal of Neurotrauma*, 20(11), 1215-1222.

- Zawadzka, M., y Kaminska, B. (2003). Immunosuppressant FK506 affects multiple signaling pathways and modulates gene expression in astrocytes. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 22(2), 202-209.
- Zawadzka, M., y Kaminska, B. (2005). A novel mechanism of FK506-mediated neuroprotection: Downregulation of cytokine expression in glial cells. *Glia*, 49(1), 36-51.
- Zeevalk, G. D., y Nicklas, W. J. (1990). Chemically induced hypoglycemia and anoxia: Relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 253(3), 1285-1292.
- Zemlyak, I., Manley, N., Sapolsky, R., y Gozes, I. (2007). NAP protects hippocampal neurons against multiple toxins. *Peptides*, 28(10), 2004-2008.
- Zhang, B., Yang, L., Konishi, Y., Maeda, N., Sakanaka, M., y Tanaka, J. (2002). Suppressive effects of phosphodiesterase type IV inhibitors on rat cultured microglial cells: Comparison with other types of cAMP-elevating agents. *Neuropharmacology*, 42(2), 262-269.
- Zhang, J., Li, Y., Cui, Y., Chen, J., Lu, M., Elias, S. B., et al. (2005). Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Brain Research*, 1034(1-2), 34-39.
- Zhang, S., Kashii, S., Yasuyoshi, H., Honda, Y., Ujihara, H., Sasa, M., et al. (2000). Involvement of NMDA-receptor in kainate-induced neurotoxicity in cultured fetal retinal neurons. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 238(3), 243-248.
- Zhang, S. X., Bondada, V., y Geddes, J. W. (2003). Evaluation of conditions for calpain inhibition in the rat spinal cord: Effective postinjury inhibition with intraspinal MDL28170 microinjection. *Journal of Neurotrauma*, 20(1), 59-67.
- Zhao, W., Xie, W., Le, W., Beers, D. R., He, Y., Henkel, J. S., et al. (2004). Activated microglia initiate motor neuron injury by a nitric oxide and glutamate-mediated mechanism. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(9), 964-977.
- Zhu, S., Stavrovskaya, I. G., Drozda, M., Kim, B. Y., Ona, V., Li, M., et al. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417(6884), 74-78.

Zimmer, J., Kristensen, B. W., Jakobsen, B., y Noraberg, J. (2000). Excitatory amino acid neurotoxicity and modulation of glutamate receptor expression in organotypic brain slice cultures. *Amino Acids*, 19(1), 7-21.