



UNIVERSITÀ DI PISA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
MORFOLOGIA E FUNZIONE NORMALE E
PATOLOGICA DI CELLULE E TESSUTI**

***EFFETTI DEL LITIO NEI NUCLEI MOTORI DEI NERVI
CRANICI IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI SCLEROSI
LATERALE AMIOTROFICA (SLA)***

Presidente

Chiar.mo Prof. Antonio Paparelli

Candidata Alessia Bartalucci

Relatore Dott.ssa Michela Ferrucci

Ciclo 2006/2008

INDICE

RIASSUNTO	i
INTRODUZIONE GENERALE	1
La Sclerosi Laterale Amiotrofica	1
Caratteristiche patologiche della malattia nel midollo spinale	2
<i>Lamina IX</i>	2
<i>Lamina VII</i>	5
Coinvolgimento dei nuclei motori del tronco encefalico nella SLA	6
L'autofagia	10
Significato dell'autofagia e suo ruolo protettivo nel sistema nevoso centrale	14
<i>Autofagia e SLA</i>	15
Il litio	17
Il litio nella SLA	22
Litio e neuronogenesi	23
INTRODUZIONE ALLO STUDIO SPERIMENTALE	26
Nuclei e nervi cranici	26
SCOPO DELLO STUDIO	31
MATERIALI E METODI	33
Gruppi sperimentali	33
Analisi comportamentale	35
Stride length test	35
Paw grip endurance (PaGE) test	36
Rotarod test	36
Analisi morfologica	37

Colorazioni istologiche	37
Analisi stereologica	38
Immunofluorescenza	39
RISULTATI	41
Il litio migliora i test comportamentali e aumenta la sopravvivenza nel topo G93A	41
Analisi morfologica	42
I nuclei motori dei nervi encefalici del topo G93A sono coinvolti nei processi degenerativi tipici della SLA: effetto del litio	42
<i>Analisi stereologica</i>	42
<i>Analisi istologica</i>	43
I nuclei oculomotori del topo G93A sono preservati dalla degenerazione: effetto del litio	44
<i>Analisi stereologica</i>	44
<i>Analisi istologica</i>	45
Il trattamento con litio riduce l'immunopositività per la GFAP e incrementa la captazione di BrdU nei nuclei lesi	45
Il litio ripristina i bottoni sinaptici ChAT-positivi sui motoneuroni nel nucleo ipoglosso	46
FIGURE	48
LEGENDE	49
DISCUSSIONE	56
BIBLIOGRAFIA	67

RIASSUNTO

Introduzione La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da una perdita selettiva dei motoneuroni nel sistema nervoso centrale. La degenerazione del motoneurone nella SLA coinvolge sia i motoneuroni superiori localizzati nella corteccia motoria sia quelli inferiori del midollo spinale e del tronco dell'encefalo. Vari studi sperimentali e clinici indicano che il trattamento cronico con sali di litio produce effetti promettenti, aumentando la sopravvivenza e rallentando il decorso della malattia.

I topi transgenici G93A che over-esprimono forme mutate dell'enzima rame-zinco superossido-dismutasi di tipo 1 (SOD1) umano sviluppano una patologia molto simile a quella osservata nei pazienti affetti da SLA e per questo sono comunemente utilizzati come modello animale di SLA.

Nella SLA umana, il coinvolgimento dei nuclei motori dei nervi encefalici contribuisce ad aggravare il quadro clinico e si trova solitamente associato a un decorso accelerato della malattia. Tuttavia, fino a questo momento, solo pochi e frammentari sono gli studi sperimentali che indagano i nuclei motori del tronco dell'encefalo nei topi G93A.

Scopo dello studio L'obiettivo primario di questo studio è stato quello di analizzare in maniera estensiva, da un punto di vista morfologico, tutti i nuclei motori del tronco dell'encefalo nel topo transgenico G93A, cercando di offrire un quadro il più possibile esaustivo che documenti il loro coinvolgimento in questo modello sperimentale di SLA. In un secondo momento l'indagine morfologica è stata rivolta ad analizzare l'effetto del trattamento cronico con sali di litio sui nuclei motori del tronco encefalico del topo G93A.

Materiali e metodi Topi transgenici G93A e i rispettivi wild-type littermate sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali: wild-type+salina, wild-type+litio, G93A+salina, G93A+litio. Il trattamento con soluzione salina o carbonato di litio (corrispondente ad una dose di litio di 1 mEq/Kg) è avvenuto a giorni alterni a partire dall'insorgenza dei sintomi fino allo stadio finale della malattia (stadio tetraplegico), quando tutti gli animali sono stati sacrificati e l'encefalo prelevato e processato per l'inclusione in paraffina. Nel corso del trattamento, gli animali sono stati sottoposti ad osservazioni comportamentali, basate sull'impiego di test motori in grado di rivelare l'insorgenza e la progressione dei sintomi.

Per ogni nucleo motore del tronco encefalico sono state eseguite sezioni seriate intervallate di 50 µm, sulle quali sono state condotte tutte le analisi stereologiche, istochimiche e immunoistochimiche, allo scopo di valutare la presenza di cambiamenti nel numero dei motoneuroni, nella loro morfologia e nell'immunopositività per specifici marcatori.

Allo scopo di rilevare il potenziale effetto neurogenetico del trattamento cronico con litio, un sottogruppo di animali è stato preventivamente trattato con il precursore modificato del DNA 5-bromo-2-deossiridina (BrdU). In questi animali è stata valutata l'entità dell'incorporazione nucleare di tale composto all'interno dei nuclei motori del tronco encefalico.

Risultati Da questo studio è emerso che:

- a) I nuclei motori dei nervi trigemino, faciale, ipoglosso, il nucleo ambiguo e il nucleo motore dorsale del vago risultano significativamente compromessi nel topo G93A. La conta stereologica e l'analisi istologica e immunoistochimica dimostrano infatti una consistente perdita di motoneuroni all'interno dei suddetti nuclei e la presenza di alterazioni morfologiche nei motoneuroni superstiti nei topi G93A trattati con salina. Al contrario, i nuclei dei nervi

responsabili dei movimenti oculari (oculomotore, trocleare, abducente) non appaiono interessati dal processo degenerativo che colpisce gli altri nuclei motori del topo G93A.

- b) Il trattamento cronico con litio dei topi G93A aumenta il numero dei motoneuroni nei nuclei lesi (ad eccezione del nucleo motore dorsale del vago) significativamente rispetto ai topi G93A trattati con salina, preserva la normale morfologia cellulare nei motoneuroni superstiti e i bottoni sinaptici ChAT-positivi sui motoneuroni del nucleo ipoglosso. Nel contempo, riduce la gliosi reattiva e induce neuronogenesi.

Conclusioni Nell'insieme, questi risultati indicano che:

- a) il topo G93A riproduce, anche a livello del tronco dell'encefalo, la SLA umana;
- b) in questo modello sperimentale il trattamento con litio sembra particolarmente protettivo per i motoneuroni somatici del tronco encefalico.

INTRODUZIONE GENERALE

La Sclerosi Laterale Amiotrofica

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA), descritta per la prima volta da Charcot nel 1874, è una grave malattia neurodegenerativa, progressiva, che interessa principalmente i motoneuroni del midollo spinale e del tronco encefalico (motoneuroni inferiori, LMN) e quelli della corteccia cerebrale (motoneuroni superiori, UMN, Rowland, 1994).

Con il termine “amiotrofica” ci si riferisce all’atrofia muscolare che deriva dalla perdita del supporto trofico fornito al muscolo dall’innervazione, mentre “sclerosi laterale” indica l’aspetto patologico delle colonne laterali della sostanza bianca del midollo spinale, che appaiono degenerate e indurite dalla severa gliosi (Rowland e Shneider, 2001).

I sintomi clinici dipendono dalle aree centrali che sono maggiormente interessate e, in generale, consistono in debolezza, atrofia muscolare e fascicolazioni; allo stadio finale, la morte avviene entro 3-5 anni dalla diagnosi a causa principalmente del blocco dei muscoli respiratori e di quelli implicati nella deglutizione (Hirano, 1991; Leigh e Swash, 1991; Rowland, 1994; Cleveland e Rothstein, 2001).

La patogenesi della SLA è prevalentemente sporadica (90% dei casi), mentre solo nel 10% dei casi è familiare. La SLA familiare ha una penetranza età-dipendente e, dal punto di vista clinico, non è distinguibile dalla forma sporadica (Hirano et al., 1984; Siddique, 1991).

Tra le forme familiari, circa il 20% è dovuto a mutazioni del gene che codifica per l’enzima rame-zinco superossido-dismutasi di tipo 1 (SOD1; Rosen et al., 1993),

che catalizza la dismutazione dell'anione superossido (O_2^-) in perossido di idrogeno (Tainer et al., 1982; Scozzafava et al., 1993).

Anche mutazioni nel gene dell'alsina, della syntaxina, della sinaptobrevina/VAMP e della dinactina sono coinvolte nell'insorgenza di forme di SLA familiare. Inoltre, i loci legati all'insorgenza della malattia sono stati identificati in numerosi cromosomi (15, 16, 18, 20 and X) e sono correlati con la demenza fronto-temporale (Pasinelli e Brown, 2006).

Esistono vari modelli animali per studiare la SLA. Il più comune consiste nell'utilizzo del topo transgenico con mutazioni puntiformi nel gene che codifica per la SOD1 (Rosen et al., 1993); ad oggi si conoscono più di 90 mutazioni in questo gene (responsabili di un sottogruppo di forme familiari di SLA), tra cui la G85R (sostituzione Gly→Arg in posizione 85), la G37R (sostituzione Gly → Arg in posizione 37) e la G93A (Bruijn et al., 1997b; Zhang et al., 2007).

Fra le varie mutazioni la G93A, caratterizzata dalla sostituzione Glicina→Alanina in posizione 93, è quella più studiata. Questi topi, infatti, sviluppano una patologia molto simile a quella osservata nei pazienti affetti da SLA e per questo sono comunemente utilizzati come modello animale di SLA (Dal Canto e Gurney, 1994).

Caratteristiche patologiche della malattia nel midollo spinale

Lamina IX

La patologia a livello del midollo spinale è stata ampiamente documentata nel modello murino di SLA familiare (Morrison et al., 1998; Martin et al., 2007).

Recentemente, Martin e collaboratori (2007) hanno condotto un dettagliato studio sulla morfologia e sul numero dei motoneuroni nel topo G93A, riportando che

questi motoneuroni vanno incontro ad una lenta degenerazione (definita “slow necrosis”) caratterizzata da un’estesa vacuolizzazione citoplasmatica.

La presenza di vacuoli nel citoplasma dei motoneuroni in degenerazione era stata descritta per la prima volta da Dal Canto e Gurney (1994), da essi considerata l’espressione patologica iniziale della malattia. Questi vacuoli, osservati in microscopia ottica nello stadio precoce della malattia, sono localizzati nei corpi cellulari dei neuroni, nel neuropilo circostante, a volte nell’assoplasma e spesso anche nei dendriti. Al contrario, il nucleo di queste cellule non mostra cambiamenti evidenti, infatti non c’è condensazione della cromatina e il margine nucleare appare regolare (Dal Canto e Gurney, 1994).

La vacuolizzazione citoplasmatica, una delle principali caratteristiche della degenerazione dei motoneuroni dei topi G93A, è stata attribuita principalmente allo swelling dei mitocondri (Dal Canto e Gurney, 1994; Wong et al., 1995; Kong e Xu, 1998). La formazione del vacuolo all’interno del mitocondrio è infatti preceduta dalla disorganizzazione delle creste, da cui deriva il particolare aspetto cribriforme di questi organelli. Maggiori dimensioni dei vacuoli determinano alterazioni mitocondriali più severe e portano ad una “linearizzazione” dell’intera struttura del mitocondrio, come conseguenza della perdita delle creste della membrana interna (Dal Canto e Gurney, 1994).

Poiché a livello ultrastrutturale è stata osservata anche dispersione di ribosomi e dilatazione delle cisterne, è stata avanzata l’ipotesi che il reticolo endoplasmatico liscio fosse la seconda struttura coinvolta nella formazione di vacuoli (Dal Canto e Gurney, 1994).

Nello stadio finale la malattia è caratterizzata da una consistente perdita di motoneuroni (Dal Canto e Gurney, 1994; Chiu et al., 1995; Mohajeri et al., 1998; Fisher et al., 2004; Martin et al., 2007). Tale perdita cellulare riguarda

principalmente la popolazione degli alfa-motoneuroni, che stretti criteri morfologici (nucleo rotondeggiante e chiaro, citoplasma con sostanza di Nissl a zolle, diametro di almeno 30 μm) hanno permesso di identificare in maniera selettiva (Martin et al., 2007). Questi criteri infatti permettono di escludere non solo astrociti, oligodendrociti e glia, ma anche la popolazione dei gamma-motoneuroni che, come risulta da altri studi, rimane pressoché invariata (Mohajeri et al., 1998).

Interessante è il fatto che nello stadio tardivo della malattia si trovano, nei neuroni e nei processi assonici, inclusioni ricche di filamenti che ricordano gli accumuli citosolici di materiale di natura filamentosa osservati nella SLA familiare (Hirano, 1991). Queste inclusioni, di aspetto ialino, appaiono come aggregati filamentosi compatti di forma sferica, con una parte centrale più densa ed una parte periferica più chiara (Dal Canto e Gurney, 1994).

Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha analizzato in dettaglio il midollo spinale del topo G93A e ha descritto un diverso grado di degenerazione dei motoneuroni nel tratto cervicale e in quello lombare, in accordo con studi precedenti (Nimchinsky et al., 2000). In breve, è stato osservato che il midollo cervicale degenera più tardivamente rispetto al midollo lombare. La maggiore perdita neuronale si osserva a livello lombare, dove il numero di alfa-motoneuroni (identificati secondo gli stessi criteri adoperati da Martin et al., 2007) appare drasticamente ridotto. I motoneuroni rimasti sono caratterizzati da un notevole incremento di dimensioni, valutabile sia in termini di area che di diametro, e appaiono fortemente vacuolizzati, mostrando inoltre, a livello ultrastrutturale, mitocondri alterati, di dimensioni circa il doppio dei mitocondri normali, con creste disorganizzate e slargate, scollamento delle membrane e matrice fortemente diluita.

Infine, nel citoplasma dei motoneuroni si nota la presenza di accumuli di alfa-sinucleina, ubiquitina e SOD1 (Bruijn et al., 1997a; Watanabe et al., 2001; Martin et al., 2007; Fornai et al., 2008a;).

Queste alterazioni, documentate specificamente nella lamina IX della sostanza grigia midollare, sono costantemente accompagnate da un'intensa gliosi reattiva (Fornai et al., 2008a).

Lamina VII

Oltre alle alterazioni motoneuronali, un numero sempre maggiore di studi riporta che anche altre cellule del midollo spinale risultano coinvolte nei processi degenerativi che caratterizzano la SLA. Infatti già le originarie osservazioni di Morrison e collaboratori (1998) avevano dimostrato che nella SLA piccoli neuroni nella lamina VII del midollo spinale degenerano prima e in maniera più severa rispetto ai motoneuroni.

Il nostro gruppo di ricerca ha confermato la drastica riduzione nei topi G93A di neuroni di piccole dimensioni localizzati nella lamina VII del midollo spinale. Sulla base delle dimensioni, della specifica localizzazione e dell'immunopositività per la calbindina D 28k e la gefirina questi neuroni sono stati identificati come tipici neuroni funicolari del II tipo di Golgi o cellule di Renshaw (Fornai et al., 2008a).

Di recente i nostri risultati sono stati replicati da Chang e Martin (2009), i quali hanno riportato una diminuzione di tali neuroni nel midollo spinale dei topi transgenici G93A.

Le cellule di Renshaw sono neuroni glicinerfici che contraggono importanti rapporti funzionali con i motoneuroni del midollo spinale, in quanto, attivati dagli assoni collaterali dei motoneuroni, inibiscono i motoneuroni stessi, costituendo il

cosiddetto “circuito collaterale ricorrente inibitorio”. Studi elettrofisiologici hanno dimostrato che questi circuiti collaterali inibitori sono notevolmente ridotti nei pazienti affetti da SLA (Shefner e Logigian, 1998).

Coinvolgimento dei nuclei motori del tronco encefalico nella SLA

Sebbene in letteratura esistano numerosi studi che documentano la malattia a livello spinale, il coinvolgimento di regioni craniali al midollo spinale non è stato finora molto indagato nei topi transgenici G93A.

Ciò appare paradossale, dal momento che nella SLA umana l’interessamento dei motoneuroni appartenenti ai nuclei motori del tronco encefalico fin dal momento dell’insorgenza della malattia (25% dei casi) è associato alle forme cliniche più gravi e porta a morte dopo circa un anno dalla diagnosi. In particolare, per la compromissione dei nuclei motori dei nervi ipoglosso e ambiguo si osservano sintomi come disartria, disfagia e difficoltà nella deglutizione e nella respirazione, mentre la degenerazione dei nuclei motori dei nervi trigemino e faciale contribuisce alla suddetta sintomatologia e alla perdita di altre importanti funzioni (DePaul e Abbs, 1987; DePaul et al., 1988; Kusaka et al., 1988; Hartmann et al., 1989; Desport et al., 2000).

Al contrario, sembra che i nuclei dei nervi oculomotori siano relativamente preservati (Cohen e Caroscio, 1983; Gizzi et al., 1992; Okamoto et al., 1993).

Dato che il tronco dell’encefalo è fortemente coinvolto nella SLA umana, sorprende il fatto che l’analisi dei nuclei motori del tronco encefalico nei topi G93A sia stata effettuata solo in pochi studi e in ciascuno di essi mai per tutti i nuclei. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato, nello studio precedente, il coinvolgimento del nucleo ambiguo, nel quale si osserva infatti una severa perdita

di alfa-motoneuroni, mentre i pochi motoneuroni superstiti appaiono fortemente vacuolizzati (Fornai et al., 2008a).

La scarsità degli studi sulla patologia dei nuclei motori del tronco dell'encefalo nei topi G93A è principalmente dovuta al fatto che questi topi sviluppano una sindrome motoria che progredisce rapidamente e che porta in pochi giorni a paralisi e morte prematura (Gurney et al., 1994; Ripps et al., 1995; Gurney, 1997a; 1997b).

Tale sintomatologia è espressione di un coinvolgimento precoce e massivo del midollo lombare; tuttavia, la patologia spinale non è l'unica a essere riprodotta in questo modello sperimentale, nel quale in effetti è stata descritta la degenerazione dei motoneuroni anche in aree motorie più craniali (Zang et al., 2004; Chung et al., 2005; Lladó et al., 2006; Niessen et al., 2006; 2007).

Un aspetto interessante riguarda la selettiva vulnerabilità dei motoneuroni del tronco encefalico ai processi neuropatologici della SLA, che Haenggeli e Kato (2002) hanno dimostrato studiando il topo G93A e altri modelli di malattia del motoneurone: i topi *pnm* (progressive motor neuronopathy) e i topi *wobbler*, caratterizzati da mutazioni spontanee che generano fenotipi che possono essere utilizzati come modelli di SLA (Duchen e Strich, 1968; Schmalbruch et al., 1991).

In particolare sono stati analizzati i nuclei motori dei nervi oculomotore, trocleare, trigemino, faciale e ipoglosso. Nello stadio finale della malattia, i topi *pnm* mostrano una significativa perdita di motoneuroni in tutti i nuclei esaminati, mentre nei topi *wobbler* la degenerazione sembra interessare in modo particolare il nucleo motore dei nervi trigemino ed ipoglosso (Haenggeli e Kato, 2002). Nei topi G93A la perdita neuronale è stata osservata nei nuclei motori dei nervi trigemino, faciale e ipoglosso; i motoneuroni dei nuclei lesi appaiono caratterizzati da una marcata vacuolizzazione e da un pattern di degenerazione simile a quello descritto

precedentemente da Dal Canto e Gurney (1995) a proposito dei motoneuroni del midollo spinale (Haenggeli e Kato, 2002; Kadoyama et al., 2007).

Questi dati sono stati ottenuti sottoponendo i nuclei motori dei nervi cranici dei topi G93A a un'accurata conta neuronale in microscopia ottica.

Altri studi sperimentali condotti sul topo G93A hanno accompagnato alla classica conta neuronale moderne tecniche di risonanza magnetica nucleare (RMN), che hanno consentito di valutare la densità neuronale, e quindi lo stato di progressione della malattia, come funzione del tempo di rilassamento T2 (Zang et al., 2004; Niessen et al., 2006). Questi studi, eseguiti *in vivo*, hanno offerto il vantaggio di correlare i sintomi motori degli animali esaminati con le immagini di T2-RMN, dimostrando una stretta correlazione tra la gravità della sintomatologia e i valori di T2 ottenuti nel midollo spinale e nell'encefalo. In particolare, i topi G93A hanno mostrato un significativo incremento del valore T2 relativo al nucleo ambiguo (Zang et al., 2004) e ai nuclei motori dei nervi trigemino, facciale (Zang et al., 2004; Niessen et al., 2006) e ipoglosso (Niessen et al., 2006) rispetto agli animali wild-type di pari età.

Inoltre, nella SLA sono documentate disfunzioni del sistema nervoso autonomo (Baltadzhieva et al., 2005). In particolare, tecniche di imaging eseguite a livello cardiaco mediante utilizzo di ^{123}I -metaiodobenzilguanidina (MIBG), un analogo della noradrenalina che viene captato dai terminali simpatici (Low, 1997; Druschky et al., 1999), hanno evidenziato una compromissione dell'innervazione simpatica cardiaca, dimostrata dalla diminuzione dell'uptake del tracciante radioattivo (Druschky et al., 1999). L'integrità del sistema nervoso autonomo a origine encefalica (sistema parasimpatico) è stata raramente oggetto di studio nella SLA. Tuttavia l'analisi immunostochimica ha evidenziato un incremento dell'immunopositività per la SOD1 nel nucleo motore dorsale del topo G93A

(Chung et al., 2003), suggerendo che la neuropatologia del tronco encefalico potrebbe estendersi a interessare anche motoneuroni appartenenti a un nucleo effettore viscerale.

L'autofagia

L'autofagia rappresenta la principale via intracellulare deputata all'eliminazione di proteine misfolded e di organelli alterati, prodotti fisiologicamente durante la vita cellulare.

L'autofagia consiste nella formazione di una struttura chiamata "fagoforo", che origina da membrane pre-esistenti nella cellula, di non ben specificata provenienza (**Figura 1**); sebbene non sia ancora del tutto chiaro, sembra che nei mammiferi il complesso di membrane a partire dalle quali si assembla l'autofagosoma derivi dal reticolo endoplasmatico (RE) e/o dal Trans Golgi Network (TGN).

Il fagoforo, struttura precoce a doppia membrana a forma semicircolare, va incontro a un processo di maturazione evolvendo nell'autofagosoma, una vescicola chiusa, anch'essa a doppia membrana, contenente molecole e/o organelli da degradare (**Figura 1**).

Una proteina fondamentale per dare inizio al processo di formazione del fagoforo è beclin1; la formazione dell'autofagosoma è invece associata all'incorporazione nel sistema di membrane di altre proteine-chiave, la fosfatidiletanolamina-light chain (LC3) e la piccola GTPasi Rab24 (Kabeya et al., 2000; Menzies et al., 2002; Mudher et al., 2004).

LC3 è una proteina associata ai microtubuli (MAP-LC3) ed esiste in due isoforme: LC3 I, di 18 kDa, e LC3 II, di 16 kDa. MAP-LC3 normalmente si associa ai microtubuli e partecipa alla dinamica del citoscheletro. Quando inizia la formazione dell'autofagosoma, MAP-LC3 si dissocia dai microtubuli e LC3 I è convertita in LC3 II, che entra a far parte della membrana esterna dell'autofagosoma nascente. Una volta completata la sua formazione, l'autofagosoma può fondersi con vacuoli di degradazione acida come i

“multivescicular body” (costituiti da endosomi precoci e tardivi) formando i cosiddetti “anfisomi”, che infine si fondono con i lisosomi formando gli “autofagolisosomi”. La fusione degli autofagosomi con i lisosomi richiede l'intervento della glicoproteina integrale di membrana lisosomiale (LAMP2) (Eskelinen, 2006). In ogni caso, gli endosomi e i lisosomi contengono un'ampia gamma di idrolasi acide che consentono la completa digestione di biomacromolecole. Così, una volta che l'autofagosoma si fonde con uno di questi organelli acidi, il suo contenuto (macro-aggregati proteici, organelli, componenti di membrana e citoplasmatici) inizia ad essere degradato dalle idrolasi acide. La fusione successiva con gli endosomi e con i lisosomi apporta la maggior varietà di idrolasi e garantisce una demolizione completa e rapida del contenuto degli autofagolisosomi. Alcuni autofagosomi, tuttavia, by-passano il compartimento endosomale e si fondono direttamente con i lisosomi (Eskelinen, 2005). In questo caso, la demolizione del contenuto delle vescicole autofagiche avviene più lentamente e l'efficienza della degradazione risulta significativamente diminuita.

L'autofagia è un processo multifasico e specificamente controllato in corrispondenza delle sue diverse fasi (induzione e formazione dell'autofagosoma, fusione dell'autofagosoma con gli organelli acidi, digestione di macromolecole) ad opera di vari fattori che agiscono come molecole di segnale (Codogno e Meijer, 2005). Un regolatore classico di questa via, e uno dei più noti, è rappresentato dalla molecola enzimatica conosciuta come la molecola bersaglio della rapamicina nei mammiferi (the mammalian Target of Rapamycin) mTOR, una proteina chinasi conservata in tutti gli eucarioti e che svolge un ruolo centrale nella regolazione della crescita e della progressione del ciclo cellulare, sensibile alla disponibilità di nutrienti (Blommaert et al., 1995; Noda e Ohsumi, 1998). Sostanze nutritive e

fattori di crescita mantengono attiva questa proteina, che a sua volta mantiene l'autofagia a una ridotta attività basale (Legros et al., 2002).

Pertanto, mTOR, attivo in presenza di adeguati livelli di nutrienti e di energia per la cellula, è un potente regolatore negativo dell'autofagia.

Al contrario, un regolatore positivo della via autofagica è il litio. Riguardo alla modalità con cui il litio agisce come induttore dell'autofagica e ai suoi effetti sulla progressione della SLA, si vedano i paragrafi successivi.

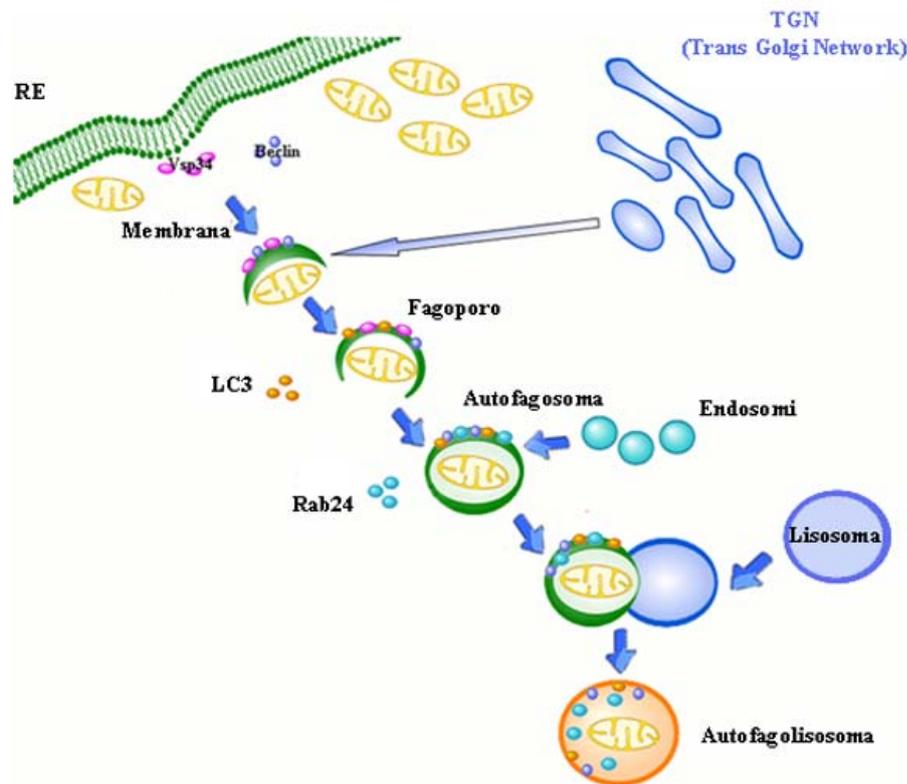


Figura 1. Rappresentazione schematica della via autofagica.

Lo schema mostra la formazione del vacuolo autofagico precoce (fagoporo) a partire da un sistema di membrane pre-esistenti provenienti dal reticolo endoplasmatico (RE) o dal Trans Golgi Network (TGN). Il fagoporo, in seguito all'intervento di proteine come LC3 e Rab24, evolve in autofagosoma.

Dall'autofagosoma si può passare all'autofagolisosoma attraverso due distinte vie: una prevede la fusione prima con i "multivescicular body" (compartimento endosomiale), per formare l'anfisoma, poi con il lisosoma, per dare l'autofagolisosoma, all'interno del quale la degradazione del materiale citoplasmatico incorporato avviene con la massima efficienza; l'altra via porta alla diretta fusione dell'autofagosoma con il lisosoma, bypassando la formazione dell'anfisoma, con una ridotta efficienza di degradazione.

Significato dell'autofagia e suo ruolo protettivo nel sistema nervoso centrale

In condizioni di deplezione di nutrienti e/o energia, i componenti cellulari non essenziali vengono degradati dalla via autofagica, per fornire alla cellula i substrati necessari per la sopravvivenza. L'autofagia viene indotta anche in risposta a vari tipi di insulto e svolge un ruolo protettivo degradando componenti cellulari potenzialmente nocivi, come proteine strutturalmente alterate e mitocondri danneggiati (Ravikumar e Rubinsztein, 2004; Castino et al., 2005; Kitazawa et al., 2008).

L'autofagia può quindi essere vista come una risposta che la cellula mette in atto per contrastare l'effetto di stimoli stressogeni che minacciano la sua sopravvivenza. Tale sistema risulterebbe quanto mai critico soprattutto nelle cellule perenni, come le cellule nervose, che non hanno la possibilità di rinnovarsi e per le quali ogni insulto ambientale è potenzialmente in grado di provocare modificazioni irreversibili. In quest'ottica, il buon funzionamento della via autofagica potrebbe svolgere un ruolo protettivo nella patogenesi e/o nella progressione delle malattie neurodegenerative (Ravikumar e Rubinsztein, 2004; Sarkar e Rubinsztein, 2006).

Come è ben noto, la formazione di aggregati intracellulari di natura essenzialmente proteica è la principale caratteristica di molte malattie neurodegenerative, come la malattia di Parkinson, la malattia di Huntington, l'atassia spino-cerebellare del III tipo e alcune forme di demenza causate da mutazioni della proteina tau (Menzies et al., 2006; Sarkar et al., 2008). Nella SLA le inclusioni neuronali sono state classicamente distinte in Bunina bodies, corpi eosinofili localizzati nel citoplasma neuronale che contengono una varietà di proteine, tra cui la transferrina, la cistatina C e inclusioni ubiquitinate (Okamoto et al., 2008). Più recentemente, le inclusioni presenti nei neuroni e, talvolta, anche nelle cellule gliali di pazienti affetti da SLA

sono state dimostrate contenere una varietà di altre proteine, come la proteina TAR legante il DNA di 43 kDa (TDP-43), il cui accumulo sembra un reperto molto frequente sia nelle forme sporadiche che in quelle familiari di malattia (Nishihira et al., 2009).

Il significato delle inclusioni neuronali è stato a lungo oggetto di accesi dibattiti. L'interpretazione corrente tende a considerare la formazione di tali inclusioni come la conseguenza di un deficit dei meccanismi cellulari deputati alla rimozione delle componenti alterate, tra cui un ruolo di primo piano spetta appunto all'autofagia. Sulla base di queste conoscenze studi recenti hanno dimostrato che la down-regulation o la parziale inibizione dell'autofagia possono innescare o aggravare i processi neurodegenerativi in vari modelli sperimentali (Ravikumar et al., 2002; Hara et al., 2006; Klionsky, 2007; Castino et al., 2008).

Autofagia e SLA

E' stato ipotizzato che alterazioni della via autofagica possano svolgere un ruolo centrale anche nella patogenesi della SLA. Questo concetto si sta facendo strada nel mondo scientifico in questi ultimi anni, soprattutto con il progredire delle conoscenze relative ai geni coinvolti nella patogenesi delle forme familiari della malattia.

Mutazioni della dineina, che svolge un ruolo critico nel trasporto e nella fusione degli autofagosomi/anfisomi ai lisosomi, sono causa di una forma genetica di SLA nel topo (Hafezparast et al., 2003; Rubinsztein et al., 2005; Teuling et al., 2008).

Un ruolo simile è svolto dalla dinactina, una proteina che interagisce con la dineina per formare un complesso che veicola il traffico di vescicole attraverso la via autofagica (La Monte et al., 2002), mentre l'alsina risulta coinvolta più a monte nel

controllo della fusione degli endosomi con gli autofagosomi per la formazione degli anfisomi (Yang et al., 2001).

Sebbene non sia stato evidenziato un ruolo diretto della SOD1 nella modulazione della via autofagica, è comunque interessante notare che tale enzima è un substrato dell'autofagia (Kabuta et al., 2006) e si accumula nei motoneuroni sia nelle forme familiari che in quelle sporadiche di SLA (Rosen et al., 1993; Shibata et al., 1994).

Il coinvolgimento della via autofagica nella patogenesi della SLA sembra sostenuto dalle tipiche alterazioni ultrastrutturali riscontrate nei motoneuroni in degenerazione in molteplici studi *in vivo* e *in vitro* (Martin, 2007), tra cui la presenza di vacuoli citoplasmatici e l'accumulo di mitocondri alterati (Martin et al., 2007; Fornai et al., 2008a).

Alla luce di queste evidenze, è stato ipotizzato che alla base della patogenesi della SLA vi sia un difetto della via autofagica e che quindi gli induttori dell'autofagia possano interferire con l'insorgenza e/o la progressione della malattia (Fornai et al., 2008a).

Il litio

Il litio è un composto impiegato oramai da anni nel trattamento dei disturbi dell'umore ed è in grado di attraversare facilmente la barriera ematoencefalica; in particolare, è utilizzato come stabilizzatore dell'umore nel trattamento delle sindromi bipolari (Manji and Lenox, 1998).

Più recente è la scoperta del ruolo neuroprotettivo del litio in diversi modelli di malattia neurodegenerativa (Chuang et al., 2002), tra cui l'ischemia cerebrale (Cappuccio et al., 2005) e la tossicità da kainato (Busceti et al., 2007).

Nonostante le numerose ricerche, il meccanismo molecolare e cellulare alla base dell'azione terapeutica del litio è ancora poco conosciuto; tuttavia sembra che molteplici target e meccanismi possano rendere conto della sua efficacia terapeutica (Jope, 1999; Manji et al., 1999).

Tra i possibili substrati alla base dell'azione del litio troviamo enzimi che svolgono azioni basilari nella sopravvivenza cellulare e nella capacità della cellula di rispondere adeguatamente a stimoli esterni, come l'enzima Inositolo-Monofosfatasi e la GSK-3beta.

L'inositolo monofosfatasi (IMPasi) catalizza l'idrolisi di inositolo monofosfato in inositolo libero, che partecipa alla via di segnale del fosfatidilinositolo.

Il fosfatidilinositolo, mediante due successive fosforilazioni ad opera di due specifiche proteine chinasi, viene trasformato in fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP₂), un fosfolipide localizzato nel foglietto interno della membrana plasmatica.

L'idrolisi del PIP₂ da parte dell'enzima fosfolipasi C dà origine a due secondi messaggeri: 1) l'inositolo 1,4,5 trifosfato (IP₃) che, liberato nel citoplasma, interagisce con un suo recettore-canale e mobilita gli ioni calcio dai depositi intracellulari localizzati in specifici organuli definiti "a scambio rapido", e 2) il

diacilglicerolo (DAG) che rimane legato alla membrana plasmatica e in questa sede attiva la proteina chinasi C, che a sua volta è in grado di fosforilare una serie di substrati a livello di specifici residui di serina e/o treonina.

In particolare, l'IP₃, essendo idrofilo, diffonde nel citoplasma, dove si lega a degli specifici recettori posti su strutture vescicolari associate al reticolo endoplasmatico.

Il recettore per l'IP₃ è un canale che, una volta aperto in seguito al legame con il suo ligando, lascia fluire gli ioni calcio dai depositi intracellulari secondo un gradiente di concentrazione. In questo modo la produzione di IP₃ è associata ad un aumento della concentrazione dello ione calcio (Ca²⁺), che nella cellula svolge molteplici funzioni tra cui la regolazione del metabolismo, della secrezione, della contrazione, dell'attività neuronale e della proliferazione (Paoletti et al., 1996).

Tale aumento è comunque transitorio perché il calcio libero nel citoplasma viene rapidamente chelato da specifiche proteine che hanno il compito controllare i livelli citoplasmatici di calcio e prevenire così fenomeni di eccitotossicità conseguenti alla presenza di un eccesso di calcio citosolico.

Il litio, già a piccole dosi, blocca il turn-over degli inositoli attraverso un meccanismo che prevede molteplici target molecolari (**Figura 2**). Infatti, il litio non solo inibisce l'IMPasi (K_i = 0,8 mM; Sarkar et al., 2005) ma, nel contempo, blocca anche l'inositolo-polifosfatasi, che converte l'IP₂ in IP, e il trasportatore di membrana degli inositoli liberi, portando così a una riduzione dei livelli intracellulari di IP₃ (Sarkar e Rubinsztein, 2006). Poiché l'IP₃ e la stimolazione del suo recettore sopprimono l'autofagia, la deplezione di IP₃ prodotta dal litio porta all'attivazione dell'autofagia (Sarkar e Rubinsztein, 2006; Criollo et al., 2007; **Figura 2**).

A dosi più alte, il litio regola l'attività di un altro enzima, la Glicogeno Sintasi Chinasi-3beta (GSK-3beta, 2 mM; Ryves e Harwood, 2001), una proteina

serina/treonina chinasi che appartiene alla via di Wnt, un'importante via di segnalazione intracellulare che regola funzioni fondamentali per la vita della cellula come la proliferazione, la migrazione, la polarità e la morte cellulare (Miller et al., 1999a; Miller, 2002).

La trasduzione del segnale nella classica via di Wnt è in grado di procedere se la GSK-3beta è inattiva, mentre uno degli effetti dell'attivazione della GSK-3beta è l'attivazione di mTOR, e quindi il blocco dell'autofagia (Sarkar et al., 2008). Pertanto, l'attivazione della via di Wnt mantiene la GSK-3beta in stato inattivo favorendo il legame di GSK-3beta con molteplici regolatori negativi. Tra questi, troviamo la proteina Akt. Il litio promuove la fosforilazione della proteina Akt, che si lega alla GSK-3beta, inibendola. Come detto, questa azione del litio si verifica per concentrazioni più elevate di quelle necessarie per l'inibizione dell'IMPasi ($K_i = 2 \text{ mM}$) con un effetto finale di segno opposto a quello ottenuto nel primo caso, ovvero il blocco dell'autofagia (Sarkar et al., 2008; **Figura 2**).

Recentemente è stato descritto un importante effetto del litio come agente neuroprotettivo. In modelli sperimentali di malattie neurodegenerative come la malattia di Huntington il trattamento con litio ha dimostrato avere un ruolo neuroprotettivo (Carmichael et al., 2002; Sarkar et al., 2008), riducendo significativamente i livelli di huntingtina mutata solubile e aggregata, il cui accumulo all'interno dei neuroni striatali è associato alla comparsa di quadri di sofferenza e di degenerazione neuronale (Weiss et al., 2008). Tale effetto del litio è apparso correlato alla clearance degli aggregati di huntingtina mutata ad opera degli enzimi della via autofagica, che è stato dimostrato essere specificamente preposta alla rimozione di molecole alterate di huntingtina (Ravikumar et al., 2002). Pertanto, l'induzione della via autofagica è stato ritenuto il meccanismo

principale con cui il litio svolge il suo ruolo protettivo nella Malattia di Huntington (Sarkar et al., 2005).

Studi successivi hanno offerto nuove evidenze della potente azione del litio come modulatore positivo dell'autofagia.

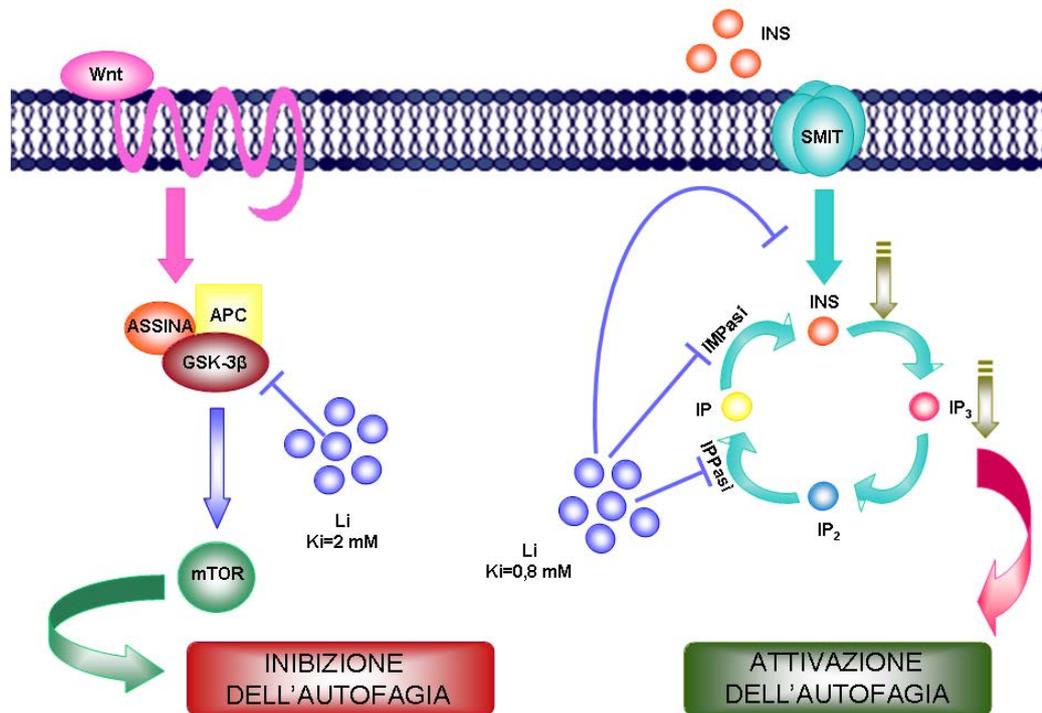


Figura 2. Meccanismi con cui il litio induce autofagia.

Il litio inibisce l'inositolo monofosfatasi (IMPasi) con una $K_i = 0,8$ mM. Questo determina una riduzione dei livelli di inositolo libero intracellulare e il blocco della sintesi dell'inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3). In questo modo, il litio riduce la concentrazione citosolica di IP_3 , che è un inibitore endogeno della via autofagica. Alla stessa dose, il litio inibisce l'uptake dell'inositolo libero extracellulare da parte del trasportatore del mio-inositolo (SMIT) e blocca l'attività dell'inositolo polifosfato-1-fosfatasi (IPPasi).

Tutti questi meccanismi portano alla riduzione dei livelli intracellulari di mio-inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3), determinando l'induzione dell'autofagia.

A concentrazioni più alte, invece, il litio inibisce l'attività della glicogeno sintasi chinasi 3-beta (GSK-3beta), che a sua volta è in grado di attivare l'autofagia. Pertanto, attraverso l'azione sulla GSK-3beta il litio inibisce l'autofagia. La K_i del litio a cui si ottiene tale effetto è di 2,00 mM.

Il litio nella SLA

Un difetto della via autofagica è stato ipotizzato anche alla base di altre malattie neurodegenerative, come la malattia di Parkinson (Anglade et al., 1997) e la SLA (Fornai et al., 2008a). In particolare, recenti studi sperimentali condotti in vari modelli di SLA hanno dimostrato che il trattamento cronico con basse dosi di litio produce un sorprendente effetto protettivo, che si manifesta con un aumento della sopravvivenza, un rallentamento nella progressione dei sintomi motori e caratterizzato, dal punto di vista istopatologico, da una preservazione delle caratteristiche morfologiche dei motoneuroni del midollo spinale (Shin et al., 2007; Feng et al., 2008; Fornai et al., 2008a). In particolare, è stato dimostrato che il trattamento con litio produce, nel midollo spinale dei topi G93A, un certo numero di effetti (rimozione degli accumuli di SOD1, di alfa-sinucleina e di ubiquitina, riduzione delle alterazioni mitocondriali e dello swelling neuronale, induzione di mitocondriogenesi) che sono tutti riconducibili all'attivazione dell'autofagia ed è in grado di modificare il decorso della malattia (Fornai et al., 2008a).

L'effetto protettivo del litio nella SLA è strettamente legato all'azione inibitoria sulla IMPasi. Infatti, questa azione protettiva si realizza soltanto per dosi molto basse di litio che sono compatibili con la sua attività sull'IMPasi (Berridge et al., 1989; Berridge e Irvine, 1989). Al contrario, a dosi più elevate il litio regola negativamente l'attività di un altro enzima, la GSK-3beta portando, come abbiamo visto, ad una regolazione negativa dell'autofagia tramite l'attivazione di mTOR (Stambolic et al., 1996).

Litio e neuronogenesi

Un altro aspetto affascinante del litio nel sistema nervoso centrale è legato al suo potenziale neuronogenetico.

E' stato infatti dimostrato che il litio promuove un significativo aumento dei progenitori delle cellule neuronali (NPC) nell'ippocampo, indirizzandone il differenziamento verso il fenotipo neuronale calbindina D 28k-positivo (Kim et al., 2004). L'induzione di NPC è stata osservata anche nel midollo spinale in seguito a trauma (Yang et al., 2006) ed è stata documentata come conseguenza della condizione neuropatologica associata alla SLA (Juan et al., 2007). Tuttavia, in queste malattie neurodegenerative croniche del midollo spinale si osserva che le cellule neo-formate, che è possibile visualizzare per mezzo dell'incorporazione di 5-bromo-2-deossiridina (BrdU), non sono capaci di differenziarsi in senso neuronale, ma seguono la via differenziativa che le conduce al fenotipo gliale (Juan et al., 2007).

Recentemente sono emersi dati interessanti riguardo alla capacità del litio di modificare il destino di tali NPC nel midollo spinale di topi G93A (Fornai et al., 2008a). E' stato infatti dimostrato che il trattamento con litio produce la comparsa di nuove cellule, in cui vi è co-localizzazione di BrdU e calbindina D 28k. Tale effetto è accompagnato da un netto aumento del numero di cellule presenti nella Lamina VII dei topi G93A, che appaiono gefirina- e calbindina D 28k-positivo, suggerendo fortemente che il trattamento cronico con litio sia in grado di indirizzare la differenziazione delle NPC in senso neuronale e specificamente verso le cellule di Renshaw (Fornai et al., 2008a).

L'effetto neuronogenetico del trattamento cronico con sali di litio, oltre che nel modello murino G93A, è stato descritto anche in ratti in seguito a traumi del midollo spinale (Su et al., 2007). In entrambi i casi, l'aumento del numero di

neuroni calbindina D 28k-positivi si accompagna alla soppressione della proliferazione gliale.

Il meccanismo alla base di questo effetto neuronogenetico del litio è ovviamente oggetto di intensi studi, ma non è da escludere che possa essere imputato ancora all'attivazione dell'autofagia, che di per sé riduce la gliosi (Su et al., 2007; Fornai et al., 2008a).

Recentemente è apparso in questo scenario un nuovo elemento che potrebbe mediare l'effetto neuroprotettivo del litio specificamente nella SLA: il fattore di crescita dell'endotelio vasale (VEGF). Infatti il litio aumenta i livelli di VEGF nei vasi cerebrali e nella glia dell'uomo (Guo et al., 2009). E' noto che il VEGF stimola la crescita dei neuriti (Sondell et al., 2000; Rosenstein et al., 2003), la sopravvivenza neuronale (Jin et al., 2000; Ogunshola et al., 2002) e promuove la neuronogenesi (Jonsson et al., 2006). Il VEGF appartiene ad una famiglia che comprende VEGF-A e VEGF-B: quest'ultimo sembra essere il maggior responsabile dell'effetto protettivo osservato nella SLA, avendo come target specifico i motoneuroni. E' stato dimostrato che in coltura il VEGF-B protegge i motoneuroni dalla degenerazione (Poesen et al., 2008) e, se iniettato nei ventricoli cerebrali, prolunga la sopravvivenza di ratti che esprimono la SOD1 mutata (Storkebaum et al., 2005). Inoltre, i topi G93A con livelli ridotti di VEGF mostrano un fenotipo più severo dei loro littermate (Lambrechts et al., 2003), mentre l'over-espressione di VEGF ritarda la neurodegenerazione e aumenta la sopravvivenza (Azzouz et al., 2004; Zheng et al., 2004; Storkebaum et al., 2005). In generale, nei pazienti affetti da SLA, è stato visto che l'espressione di VEGF diminuisce nel midollo spinale (Brockington et al., 2006). L'attività biologica del VEGF è mediata dal suo legame con il recettore e porta all'inibizione della GSK-3beta e alla modulazione dell'espressione del VEGF attraverso la stabilizzazione

della β -catenina, uno dei substrati della GSK-3 β (Skurk et al., 2005). Il coinvolgimento di altre vie nel meccanismo d'azione del litio è in linea con i molteplici effetti del litio sul SNC. Queste ed altre recenti scoperte supportano l'ipotesi che il litio promuova i processi morfogenetici, compresi neurogenesi, neuronogenesi e sinaptogenesi, attraverso la modulazione dei meccanismi di base della biologia cellulare, probabilmente ripercorrendo quegli step che avvengono durante lo sviluppo.

INTRODUZIONE ALLO STUDIO SPERIMENTALE

Nuclei e nervi cranici

Nell'ambito delle dodici paia di nervi cranici (**Figura 3**), dieci appartengono, per provenienza e destinazione, al tronco encefalico.

I nervi oculomotore (3N) e trocleare (4N), nervi effettori, originano dal mesencefalo e innervano i muscoli che controllano i movimenti oculari.

Il ponte contiene quattro paia di nervi cranici:

- il nervo trigemino (5N) è un nervo misto, in quanto ha sia una funzione sensitiva (innervazione somato-sensitiva del volto e della cute, delle mucose del cavo orale, dei denti e delle cavità nasali) che motoria (innervazione dei muscoli masticatori).
- Il nervo abducente (6N) è un nervo motore che, come i nervi oculomotore e trocleare, innerva i muscoli del bulbo oculare.
- Il nervo faciale (7N) è un nervo misto, con una radice motoria, che innerva i muscoli mimici e una radice sensitiva, importante per la percezione del gusto in quanto innerva i recettori gustativi della lingua.
- Il nervo vestibolo-cocleare (8N) è un nervo esclusivamente sensitivo ed è costituito da due parti distinte: la componente vestibolare, responsabile del mantenimento dell'equilibrio, innerva i canali semicircolari, il sacco, l'otricolo; la componente cocleare innerva l'organo di Corti, raccogliendo le informazioni uditive.

Il bulbo presenta quattro paia di nervi cranici, ciascuno dei quali è costituito da numerose radici che originano da differenti zone in senso rostro-caudale:

- il nervo glossofaringeo (9N), è un nervo misto, con una preminente componente sensitiva, che ha come funzione principale quella di fornire l'innervazione sensitiva della faringe e di innervare i recettori gustativi del terzo posteriore della lingua. Un piccolo contingente di fibre motrici somatiche, che originano dal nucleo ambiguo, si distribuiscono al muscolo costrittore superiore della faringe e al muscolo stilofaringeo.
- Il nervo vago (10N), un nervo misto, ha numerosissime funzioni sensitive ed effettrici, sia somatiche che viscerali. In particolare, la componente motoria somatica del nervo vago (destinata alla muscolatura striata della faringe, della parte superiore dell'esofago e della laringe) proviene dal nucleo ambiguo, situato nel bulbo, mentre la componente motoria viscerale (responsabile della maggior parte dell'innervazione autonoma viscerale) proviene dal nucleo motore dorsale del vago, situato anch'esso nel bulbo.
- I nervi accessorio (11N) ed ipoglosso (12N) hanno solamente la componente motoria, innervando rispettivamente alcuni muscoli del collo e i muscoli della lingua.

I nuclei sensitivi e motori del tronco encefalico sono analoghi rispettivamente alle corna posteriori e a quelle anteriori del midollo spinale. Infatti, nell'embriogenesi i precursori neuronali di tutto il SNC sono rappresentati da cellule che si trovano nella zona ventricolare della cavità del tubo neurale. Tali precursori migrano per andare a formare due ammassi di neuroni in via di sviluppo, la lamina alare e la lamina basale. Inizialmente la lamina alare è localizzata nella porzione dorsale della parete del tubo neurale e media le funzioni sensitive; la lamina basale è invece localizzata nella porzione ventrale della parete del tubo neurale e media le funzioni effettrici. Si viene così a creare un'organizzazione funzionale secondo uno

schema dorso-ventrale. I neuroni che si sviluppano dalla lamina alare vanno a costituire gli interneuroni e i neuroni di proiezione delle corna posteriori del midollo spinale; la maggior parte dei neuroni che si sviluppa dalla lamina basale dà invece origine agli interneuroni e ai motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale.

Al contrario, nel bulbo e nel ponte in via di sviluppo i cordoni di cellule delle lamine alari e basali perdono presto l'originario orientamento dorso-ventrale tipico del tubo neurale e si allineano dalla superficie laterale verso la linea mediana. Tutto ciò si verifica in quanto in corrispondenza del passaggio dal midollo spinale al tronco encefalico, la cavità del tubo neurale "si apre" sulla superficie dorsale per formare il IV ventricolo. La sostanza grigia viene così a sua volta ad aprirsi come le pagine di un libro: ciò che nel midollo spinale è posteriore nel tronco dell'encefalo diventa laterale e ciò che nel midollo spinale è anteriore nel tronco dell'encefalo si ritrova mediale.

Un'ulteriore differenza consiste nel fatto che a livello del midollo spinale la periferia muscolare si sviluppa a partire da specifiche unità di origine mesodermica, i "somiti", a ciascuno dei quali corrisponde una vertebra e un segmento del midollo spinale. Ogni segmento del midollo spinale fornisce l'innervazione sensitiva e motoria alla cute e ai muscoli di una particolare regione del corpo, quella che deriva dallo stesso somite dal quale ha avuto origine quel determinato segmento del midollo spinale. La segmentazione del midollo spinale è presente anche a sviluppo ultimato e corrisponde alla serie di radici posteriori e anteriori che emergono dalla superficie stessa del midollo.

I muscoli striati cranici si sviluppano sia dai somiti occipitali sia dagli archi branchiali, strutture che si formano durante lo sviluppo embrionale in corrispondenza della superficie rostrale dell'embrione, ricoperte esternamente

dall'ectoderma ed internamente dall'entoderma. Gli archi branchiali daranno origine alla muscolatura branchiale (muscoli del palato molle, della faringe, della laringe, della parte superiore dell'esofago, muscoli mimici e masticatori), che sarà innervata dai nuclei motori branchiali, localizzati ventralmente alla superficie acqueduttale.

Quindi, la posizione dei motoneuroni che innervano muscoli di origine diversa (branchiomeric) è differente rispetto a quella dei motoneuroni che innervano i muscoli di origine somatica. Pertanto, nel tronco dell'encefalo le colonne motorie somatiche si trovano in "prima posizione", medialmente rispetto al solco limitante, mentre le colonne branchiomeriche (corrispondenti ai nuclei motori somatici dei nervi 5N, 7N, 9N, 10N) si trovano in posizione più arretrata, nella regione della formazione reticolare ("seconda posizione"; Martin, 2005).

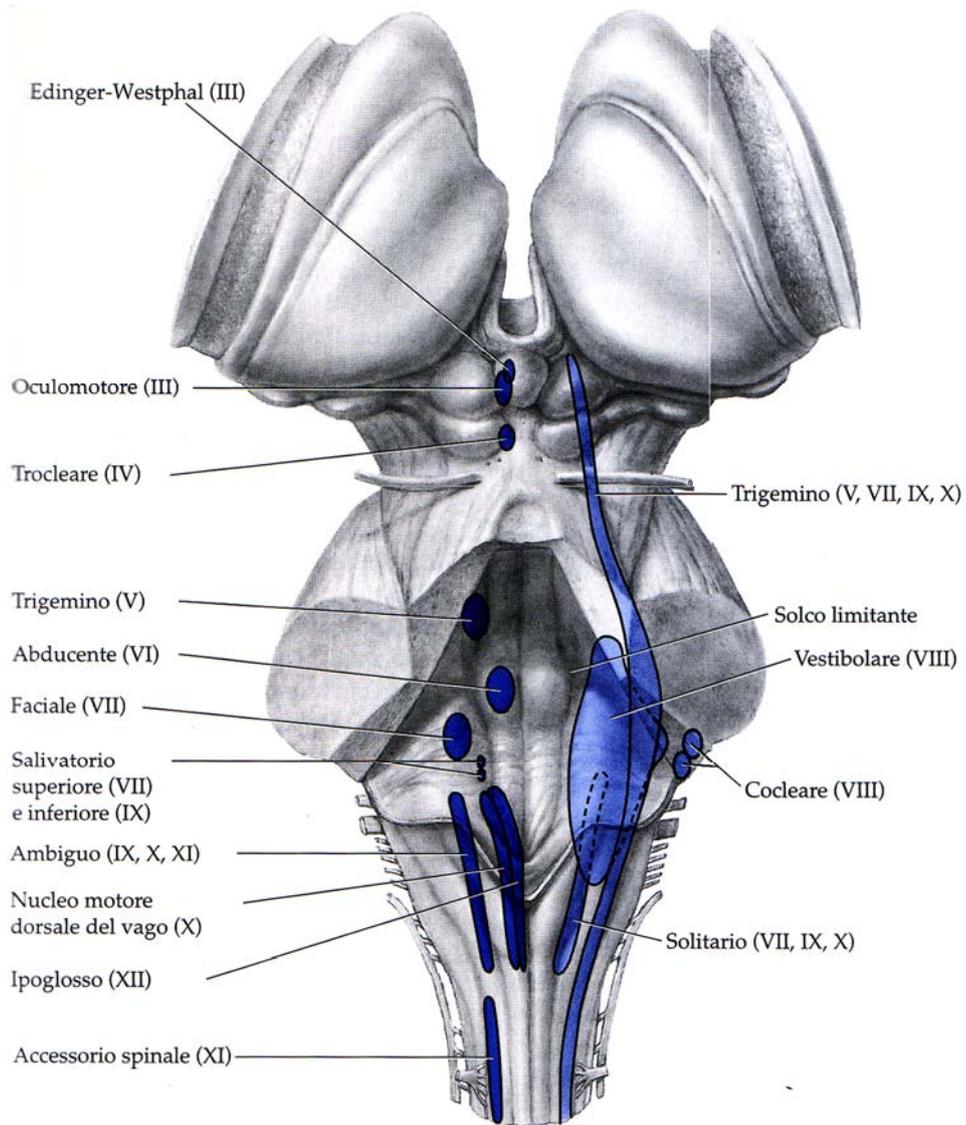


Figura 3. Tronco encefalico visto dorsalmente.

La figura mostra le sedi dei nuclei dei nervi cranici.

SCOPO DELLO STUDIO

Il primo obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare in maniera sistematica e da un punto di vista prettamente morfologico tutti i nuclei motori del tronco dell'encefalo nel topo G93A, cercando di descrivere in modo esauriente il loro coinvolgimento nella SLA.

Inoltre, visti i risultati dimostrati a livello midollare, l'indagine morfologica si è rivolta ad analizzare i potenziali effetti protettivi del trattamento cronico con sali di litio anche a livello dei nuclei motori del tronco encefalico.

Nel corso del trattamento, gli animali sono stati sottoposti ad osservazioni comportamentali, basate sull'impiego di test motori in grado di rivelare l'insorgenza dei sintomi e, pertanto, di documentare l'inizio della malattia. L'analisi morfologica è stata condotta in microscopia ottica convenzionale e in microscopia confocale. In particolare, per ogni nucleo motore del tronco encefalico sono state eseguite analisi stereologiche, istochimiche e immunohistochimiche, allo scopo di valutare la presenza di cambiamenti nel numero dei motoneuroni, nella loro morfologia e nell'immunopositività per specifiche proteine.

Gli studi sul midollo spinale hanno mostrato una perdita delle afferenze inibitorie, provenienti dalle cellule di Renshaw, ai motoneuroni.

Poiché le cellule di Renshaw non sono presenti nei nuclei motori del tronco dell'encefalo, l'analisi delle afferenze ai motoneuroni è stata ottenuta analizzando la densità dei bottoni sinaptici sui corpi cellulari dei motoneuroni nel nucleo del nervo ipoglosso. Del resto, un recente studio ha documentato una perdita di bottoni sinaptici calbindina-positivi nei motoneuroni del midollo spinale del topo G93A (Chang e Martin, 2009).

Infine, un ulteriore aspetto indagato in questo studio è stato il potenziale effetto neurogenetico del trattamento cronico con litio nel tronco encefalico. Sono stati quindi impiegati animali preventivamente trattati con il precursore modificato del DNA, BrdU, nei quali è stata valutata l'entità dell'incorporazione nucleare di tale composto all'interno dei nuclei motori del tronco encefalico.

Tutti gli studi sono stati condotti su animali transgenici G93A giunti al termine del naturale decorso della malattia e relativi WT littermate.

MATERIALI E METODI

Gruppi sperimentali

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi transgenici G93A, maschi, di 58 giorni, e relativi wild-type littermate, forniti dai laboratori Jackson (Bar Harbor, Maine, USA). Gli animali sono stati stabulati in numero di 3 per gabbia per 7 giorni prima dell'inizio delle procedure sperimentali, con libero accesso a cibo e acqua *ad libitum*, cicli di luce/buio di 12 ore ciascuno e temperatura costante di 20°C.

Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali (n=6 per ciascun gruppo):

-wild-type+salina;

-wild-type+litio;

-G93A+salina;

-G93A+litio.

Il trattamento (con soluzione salina o carbonato di litio) è iniziato allo stadio pre-sintomatico, corrispondente a 67 giorni di età. Gli animali hanno ricevuto soluzione salina (cloruro di sodio 0,9%) o carbonato di litio (corrispondente ad una dose di litio di 1 mEq/Kg; Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA), somministrati per via intraperitoneale (i.p.) a giorni alterni.

Il volume di iniezione è stato di 200 µl.

Sottogruppi di animali hanno ricevuto iniezioni di BrdU (50 mg/kg, i.p., a giorni alterni; Sigma) a partire dal 100° giorno di età.

Prima dell'inizio del trattamento sono stati condotti test comportamentali per determinare il momento esatto dell'insorgenza dei sintomi. Le valutazioni comportamentali sono state ripetute nel corso del trattamento con frequenza

settimanale per documentare la progressione dei sintomi (vedi più avanti “Analisi comportamentale”).

Tutti gli animali sono stati sacrificati al raggiungimento dello stadio tetraplegico.

Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con il Consiglio Direttivo Europeo 86/609/EEC per l'utilizzo e la cura degli animali da laboratorio.

Analisi comportamentale

I test comportamentali, eseguiti a partire dal 65° giorno di vita, hanno permesso di valutare la diminuzione dell'attività motoria, della forza muscolare e della coordinazione. Inoltre, sono stati valutati la perdita del riflesso di abduzione e il tremore. I test motori eseguiti sono stati i seguenti: stride length test, paw grip endurance (PaGE) test, rotarod.

I test motori, eseguiti da due osservatori in cieco, sono stati ripetuti ogni settimana per tutti i gruppi sperimentali per evitare bias dovuti all'insorgenza di abitudine.

Come parametro aggiuntivo, è stato controllato il peso corporeo.

I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza ANOVA in combinazione con il test post-hoc di Scheffè; l'ipotesi nulla è stata rifiutata per $p < 0,05$.

Stride length test

Lo stride length test è stato eseguito, seppur con piccole modifiche, secondo il metodo descritto da Fernagut (Fernagut et al, 2002).

Gli animali sono stati posti all'interno di un box (80x80x30 cm) illuminato, nel quale un corridoio delle dimensioni di 75x5 cm serviva a condurli all'interno di un piccolo locale buio (20x15x10 cm). Le zampe posteriori degli animali sono state colorate con inchiostro blu in modo che le tracce del loro spostamento potessero rimanere impresse sulla carta posta sul pavimento del corridoio. La lunghezza dei passi, data dalla distanza tra due impronte successive, è stata così misurata manualmente (cm).

Per ogni tragitto sono state misurate le tre distanze maggiori, che sono state considerate corrispondenti alla massima velocità di spostamento dell'animale. La media tra queste tre misure ha fornito il dato finale relativo all'animale stesso.

Paw grip endurance (PaGE) test

La forza muscolare è stata valutata con il PaGE test (Weydt et al., 2003).

Gli animali sono stati posti, uno alla volta, su una griglia, che veniva agitata per indurli ad aggrapparsi alla griglia stessa (Shin et al., 2007). Questa è stata poi lentamente capovolta ed è stato registrato il tempo durante il quale il topo è rimasto aggrappato alla griglia. La durata massima di ogni prova del test è stata di 90 secondi.

Per ogni topo sono stati misurati tre tempi distinti, il maggiore dei quali è stato è stato considerato come il dato finale relativo all'animale stesso.

Rotarod test

La perdita dell'attività motoria è stata valutata con il Rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH).

Ogni topo è stato messo su una ruota che girava alla velocità di 15 rpm ed è stato registrato il tempo durante il quale il topo è rimasto sulla ruota senza cadere (fino a un massimo di 600 sec). Per ogni animale sono state eseguite tre prove consecutive e il risultato migliore è stato registrato come dato finale.

Analisi morfologica

Gli animali sono stati sacrificati mediante anestesia con cloralio idrato e perfusi con soluzione salina e paraformaldeide al 4% (in tampone fosfato 0,1 M, pH 7.3), i loro encefali prelevati, immersi nella stessa soluzione di fissativo per 24 ore e successivamente trasferiti in alcol al 70% overnight a 4°C. I campioni sono stati disidratati mediante passaggi successivi in alcol a concentrazione crescente, immersi in xilolo per qualche ora e infine inclusi in paraffina (Merck, temperatura di fusione 56-58°C). Gli encefali sono stati tagliati in sezioni coronali per mezzo di un microtomo, che ha permesso di ottenere fettine di 7-8 µm di spessore. Sezioni corrispondenti ai nuclei motori del tronco dell'encefalo sono state raccolte in un preciso ordine anatomico e montate su vetrini polilisinati; per l'identificazione dei nuclei ci siamo serviti dell'atlante del topo Paxinos & Franklin (2004) basato sulle coordinate stereotassiche.

Le sezioni sono state asciugate a 37°C, immerse in xilolo per rimuovere la paraffina e reidratate mediante passaggi successivi in alcol a concentrazione decrescente.

Sulle sezioni è stata infine effettuata l'analisi istologica, stereologica ed immunohistochimica (immunofluorescenza), che hanno consentito di analizzare gli effetti del trattamento cronico con litio sulla morfologia e sul numero di neuroni nei nuclei motori del tronco dell'encefalo.

Colorazioni istologiche

Per l'analisi stereologica dei neuroni dei nuclei del tronco dell'encefalo, sezioni seriate di 8 µm (raccolte come descritto più avanti nel paragrafo dedicato) sono state colorate con cresyl violetto. Un set parallelo di sezioni è stato colorato con ematossilina-eosina ed è stato destinato all'analisi morfologica. Tutte le sezioni

sono state montate con balsamo DPX e vetrino coprioggetto ed osservate al microscopio ottico (Nikon Eclipse 80i, Giappone).

Analisi stereologica

L'analisi stereologica è stata condotta su sezioni seriate, non consecutive, colorate con cresyl violetto. Le sezioni sono state poi osservate al microscopio ottico, dove è stata condotta una conta del numero dei motoneuroni per ciascun nucleo.

L'identificazione dei nuclei del tronco encefalico è stata confermata utilizzando le corrispondenti tavole dell'atlante del topo di Paxinos e Franklin (2004) basato sulle coordinate stereotassiche.

Per ciascun nucleo sono state analizzate sezioni a livello delle seguenti coordinate stereotassiche (espresse in mm posteriori al bregma):

- a. 3.80-4.24 per il nucleo del nervo oculomotore;
- b. 4.36-4.48 per il nucleo del nervo trocleare;
- c. 4.96-5.34 per il nucleo motore del trigemino;
- d. 5.52-5.80 per il nucleo del nervo abducente;
- e. 5.68-6.48 per il nucleo del nervo faciale;
- f. 6.70-8.00 per il nucleo ambiguo;
- g. 6.50-7.90 per il nucleo motore dorsale del vago;
- h. 7.00-8.12 per il nucleo del nervo ipoglosso.

La perdita neuronale è stata valutata mediante conte del numero di neuroni ad un ingrandimento di 20x, eseguite da due diversi osservatori in cieco.

Poiché i nuclei motori dei nervi cranici sono ben definiti da un punto di vista morfologico, sono stati contati i neuroni di tutti i nuclei. Per essere sicuri di analizzare neuroni diversi, le conte sono state effettuate su una sezione ogni

cinque, in modo che fossero distanziate di circa 50 μm l'una dall'altra, in accordo con vari autori (Haenggeli and Kato, 2002; Lladò et al., 2006).

I motoneuroni sono stati identificati seguendo uno stretto criterio morfologico: cellule multipolari con citoplasma scuro, nucleo non condensato, chiaro e nucleolo ben evidente. I neuroni del tronco dell'encefalo, infatti, sono generalmente più piccoli di quelli spinali; inoltre, esiste una certa variabilità nelle dimensioni dei motoneuroni tra i diversi nuclei del tronco encefalico. Per questo motivo, la nostra analisi ha preso in esame tutti i neuroni con un diametro maggiore di 15 μm , misurato mediante utilizzo di un software di analisi dell'immagine (Molecular Machine and Industries & AG, Glattburgh, Switzerland), che consente di disegnare il diametro della cellula osservata e di leggere automaticamente il corrispondente valore numerico.

Il numero di neuroni per topo ottenuto da ciascun osservatore è stato usato per ottenere il valore medio per ogni gruppo. Per l'analisi statistica i dati sono stati confrontati per mezzo dell'ANOVA, seguita da test posthoc; l'ipotesi nulla è stata rifiutata per $p < 0,05$.

Immunofluorescenza

Per l'immunofluorescenza le sezioni sono state incubate con una soluzione di siero bloccante (normal donkey serum 5%, Triton X-100 0,3%, tampone fosfato), per 1 ora a temperatura ambiente, e successivamente con anticorpi primari diretti contro:

- la proteina gliale fibrillare acida (GFAP, 1:500, Chemicon, Billerica, MA USA), per valutare la proliferazione gliale;
- la colino acetil-transferasi (ChAT, 1:100, Chemicon), per valutare la densità dei bottoni sinaptici sui motoneuroni (quantificando così le terminazioni nervose eccitatorie);

- la BrdU (1:500, Sigma), per valutare la neurogenesi;
- il NeuN (NueN, 1:100, Chemicon), per identificare la popolazione neuronale.

Tutti gli anticorpi primari sono stati diluiti in una soluzione contenente tampone fosfato e TritonX-100 ed incubati overnight a 4°C.

Successivamente, le sezioni sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari (Jackson ImmunoResearch Laboratories) coniugati a Cy5 (colore blu), Cy3 (colore rosso) e Cy2 (colore verde).

Tutti gli anticorpi secondari sono stati usati alla diluizione di 1:100.

Le sezioni processate per l'immunofluorescenza sono state osservate al microscopio confocale a scansione laser (CLSM, Zeiss) dotato di quattro fasci di luci laser (488 [Cy2], 543 [Cy3], 633 [Cy5], utilizzando il programma di analisi dell'immagine del CLSM (LSM software2.3, Zeiss).

RISULTATI

Il litio migliora i test comportamentali e aumenta la sopravvivenza nel topo G93A

Il trattamento cronico con litio ha prolungato il tempo medio di sopravvivenza dei topi G93A da $133,33 \pm 0,84$ a $147,33 \pm 2,02$ giorni, aumentando la durata della malattia. Inoltre, i topi G93A trattati con litio hanno mostrato un'attività motoria significativamente migliore rispetto a quelli che hanno ricevuto salina e tale miglioramento è stato registrato in tutti i test comportamentali eseguiti (stride length test, PaGE test, rotarod test; dati non mostrati).

In particolare, le attività motorie dei topi G93A trattati con salina registrate ai vari test comportamentali hanno mostrato peggioramenti significativi in confronto ai topi G93A trattati con litio ai seguenti tempi: al 121° giorno per lo stride length test ($4,92 \pm 0,08$ cm vs $5,52 \pm 0,09$ cm), al 73° giorno per il PaGE test ($68,33 \pm 8,03$ sec vs 90 sec-tempo max), al 93° giorno per il rotarod ($332,67 \pm 65,77$ sec vs 600 sec-tempo max).

Il trattamento con litio non ha avuto effetto sul peso corporeo.

Analisi morfologica

I nuclei motori dei nervi encefalici del topo G93A sono coinvolti nei processi degenerativi tipici della SLA: effetto del litio

Analisi stereologica

Dalla conta stereologica è emerso che nei topi G93A trattati con salina, rispetto ai topi WT, si ha una significativa perdita neuronale a livello dei nuclei motori del trigemino ($117,76 \pm 19,95$ vs $236,83 \pm 25,00$), del faciale ($238,42 \pm 21,77$ vs $528,92 \pm 42,30$), del nucleo ambiguo ($63,67 \pm 3,33$ vs $155,00 \pm 15,00$) e del nucleo ipoglosso ($132,39 \pm 12,96$ vs $422,80 \pm 42,12$) (**Figure 4a-7a**).

In particolare, la maggiore perdita neuronale è stata osservata nel nucleo ipoglosso, dove si ha una riduzione del 68,69% nel numero di motoneuroni contati nei topi G93A trattati con salina rispetto a quelli contati nei topi WT; tale riduzione è leggermente inferiore, seppur significativa, negli altri nuclei interessati dalla malattia (58,92% nel nucleo ambiguo, 54,92% nel nucleo faciale, 50,28% nel nucleo motore del nervo trigemino).

Sorprendentemente, la perdita neuronale non coinvolge soltanto i nuclei motori somatici dei nervi cranici, ma si estende anche ad un nucleo effettore viscerale, il nucleo motore dorsale del nervo vago. In questo nucleo è stata infatti misurata una riduzione cellulare del 31,34% nei topi G93A trattati con salina rispetto ai topi WT (da $140,75 \pm 30,28$ a $205,00 \pm 27,12$; **Figura 8a**).

Il trattamento con litio si è rivelato protettivo per tutti i nuclei motori somatici lesi in quanto ha ridotto notevolmente la perdita cellulare, preservando parzialmente il numero dei motoneuroni (**Figure 4a-7a**).

In particolare nei topi G93A trattati con litio, rispetto a quelli trattati con salina, l'incremento nella popolazione neuronale è del 53,41% nel nucleo motore del faciale ($365,76 \pm 13,05$ vs $238,42 \pm 21,77$), del 34,66% nel nucleo motore del trigemino ($158,58 \pm 6,38$ vs $117,76 \pm 19,95$) e del 37,03% nel nucleo dell'ipoglosso ($181,42 \pm 3,73$ vs $132,39 \pm 12,96$).

Il maggiore effetto protettivo del litio è stato osservato nel nucleo ambiguo (**Figura 6a**) dove l'incremento nel numero di motoneuroni rispetto ai topi G93A trattati con salina è del 79,05% (114 ± 4 vs $63,67 \pm 3,33$).

Nessun effetto protettivo del litio è stato invece osservato nel nucleo motore dorsale del vago, caratterizzato da una marcata riduzione cellulare in tutti gli animali G93A analizzati (**Figura 8a**).

I valori riportati nei grafici sono espressi come la media \pm l'errore standard (ES).

L'ipotesi nulla è stata rifiutata per $p < 0,05$.

Analisi istologica

L'analisi stereologica è stata affiancata da un'indagine di tipo qualitativo, che ha messo in evidenza, da un punto di vista prettamente morfologico, la presenza di un'estesa degenerazione in tutti i nuclei lesi dei topi G93A trattati con salina. In particolare, a basso ingrandimento appare evidente la diminuzione della densità neuronale nei nuclei motori dei nervi trigemino (**Figura 4b**), faciale (**Figura 5b**), nel nucleo ambiguo (**Figura 6b**) e nel nucleo ipoglosso (**Figura 7b**) dei topi G93A trattati con salina rispetto ai topi WT.

In particolare, come visibile nelle immagini ad alto ingrandimento, i pochi neuroni superstiti presentano una morfologia alterata, caratterizzata da una forma più irregolare e da un citoplasma più diluito e vacuolizzato (**Figure 4b-7b**). La

vacuolizzazione è particolarmente evidente nei motoneuroni del nucleo ambiguo e del nucleo ipoglosso (**Figure 6b e 7b**, rispettivamente).

Il litio protegge i motoneuroni dalla degenerazione e preserva la normale morfologia dei motoneuroni nei topi G93A. In seguito a trattamento con litio, infatti, l'aspetto istologico dei nuclei appare normale e la densità neuronale è maggiore rispetto a quella osservata nei topi G93A trattati con salina (**Figure 4b-7b**, cresyl violetto). Inoltre, il trattamento con litio attenua sensibilmente le alterazioni morfologiche nei motoneuroni superstiti, il cui citoplasma appare più denso e meno vacuolizzato rispetto a quello dei topi G93A trattati con salina, come evidenziato dall'intensa basofilia (**Figure 4b-7b**, ematossilina-eosina).

Consistente con l'estesa degenerazione rilevata nel nucleo motore dorsale del nervo vago di tutti gli animali G93A, la popolazione cellulare e le caratteristiche morfologiche dei singoli motoneuroni presentano un quadro di alterazione simile a quello descritto per i motoneuroni degli altri nuclei, che non viene modificato dal trattamento con litio (**Figura 8b**, ematossilina-eosina).

I nuclei oculomotori del topo G93A sono preservati dalla degenerazione:

effetto del litio

Analisi stereologica

I nuclei oculomotori (oculomotore, trocleare, abducente; **Figure 9-11**), contrariamente a quanto visto per gli altri nuclei motori, sono preservati nei topi G93A.

La conta stereologica non ha riportato differenze significative nel numero di neuroni contati in questi topi rispetto a quelli contati nei topi WT (**Figure 9a-11a**), dimostrando che questi nuclei vengono risparmiati dalla degenerazione in tutti gli animali transgenici analizzati.

Il trattamento con litio non ha modificato tali risultati, infatti il numero di motoneuroni contati nei nuclei oculomotori dei topi G93A trattati con salina è paragonabile a quello contato negli stessi nuclei dei topi G93A trattati con litio (**Figure 9a-11a**).

Analisi istologica

Le colorazioni istochimiche non hanno mostrato cambiamenti evidenti nell'aspetto istologico dei nuclei oculomotori dei topi G93A, nei quali la densità cellulare appare normale, simile a quella degli animali di controllo (**Figure 9b-11b**, cresyl violetto).

Anche la morfologia neuronale è apparentemente preservata; ad alto ingrandimento i motoneuroni presentano la normale forma multipolare, nucleo e nucleolo ben evidenti e un citoplasma intensamente basofilo e privo della vacuolizzazione osservata nei nuclei che vanno incontro a degenerazione (**Figure 9b-11b**, ematossilina-eosina).

Il trattamento con litio non ha modificato tali caratteristiche.

Il trattamento con litio riduce l'immunopositività per la GFAP e incrementa la captazione di BrdU nei nuclei lesi

La tripla immunofluorescenza per GFAP, NeuN e BrdU in microscopia confocale ha consentito di osservare l'immunopositività per questi marker in maniera concomitante nella stessa sezione istologica.

Come mostrato nell'immagine rappresentativa relativa al nucleo motore del nervo faciale in **Figura 12**, i topi G93A trattati con salina presentano un'intensa immunofluorescenza per la GFAP rispetto ai topi WT (in verde), a cui si accompagna una notevole perdita di cellule NeuN-positive, come dimostrato dalla

diminuzione del segnale immunofluorescente per questo marcatore neuronale (in rosso).

Il trattamento con litio ha ridotto la GFAP-immunopositività e ha provocato un incremento di cellule NeuN-positive (**Figura 12**).

Infine, l'immunofluorescenza per la BrdU ha rilevato interessanti effetti del trattamento con litio sulla comparsa di nuove cellule all'interno dei nuclei motori lesi. Infatti, l'immunopositività per la BrdU, che tra l'altro appare moderatamente incrementata nei topi G93A trattati con salina rispetto ai WT, risulta marcatamente incrementata nei topi G93A in seguito al trattamento con litio (**Figura 12**, in blu).

Il dato singolare è rappresentato non tanto dal rilevamento del semplice incremento dell'immunopositività per tale precursore del DNA, ma soprattutto dalla sua co-localizzazione con il marcatore neuronale NeuN, che si verifica essenzialmente soltanto nei neuroni dei topi G93A trattati con litio, come dimostrato dalla comparsa di un quarto colore, il rosa, come risultato del "merge" tra i due marker NeuN+BrdU (rosso+blu, rispettivamente) (**Figura 12**).

Un simile quadro immunoistochimico è stato osservato in tutti i nuclei motori lesi (dati non mostrati).

Al contrario, nei nuclei oculomotori dei topi G93A, sia trattati con salina che con litio, non sono stati osservati cambiamenti significativi nell'immunopositività per queste proteine, che appare paragonabile in tutti i gruppi di trattamento (dati non mostrati).

Il litio ripristina i bottoni sinaptici ChAT-positivi sui motoneuroni del nucleo ipoglosso

L'immunofluorescenza per la ChAT, condotta su sezioni del nucleo ipoglosso, ha consentito di evidenziare i bottoni sinaptici sui motoneuroni di questo nucleo.

Come mostrato in **Figura 13**, nei topi G93A trattati con salina si osserva una deplezione dei bottoni sinaptici ChAT-positivi rispetto ai topi WT. Anche in questo caso, il trattamento con litio si è rivelato efficace nel promuovere una evidente preservazione di tali bottoni sinaptici, la cui densità sui corpi cellulari dei motoneuroni dei topi G93A trattati con litio appare simile a quella osservata nei topi WT (**Figura 13**).

FIGURE

Nucleo motore del nervo trigemino

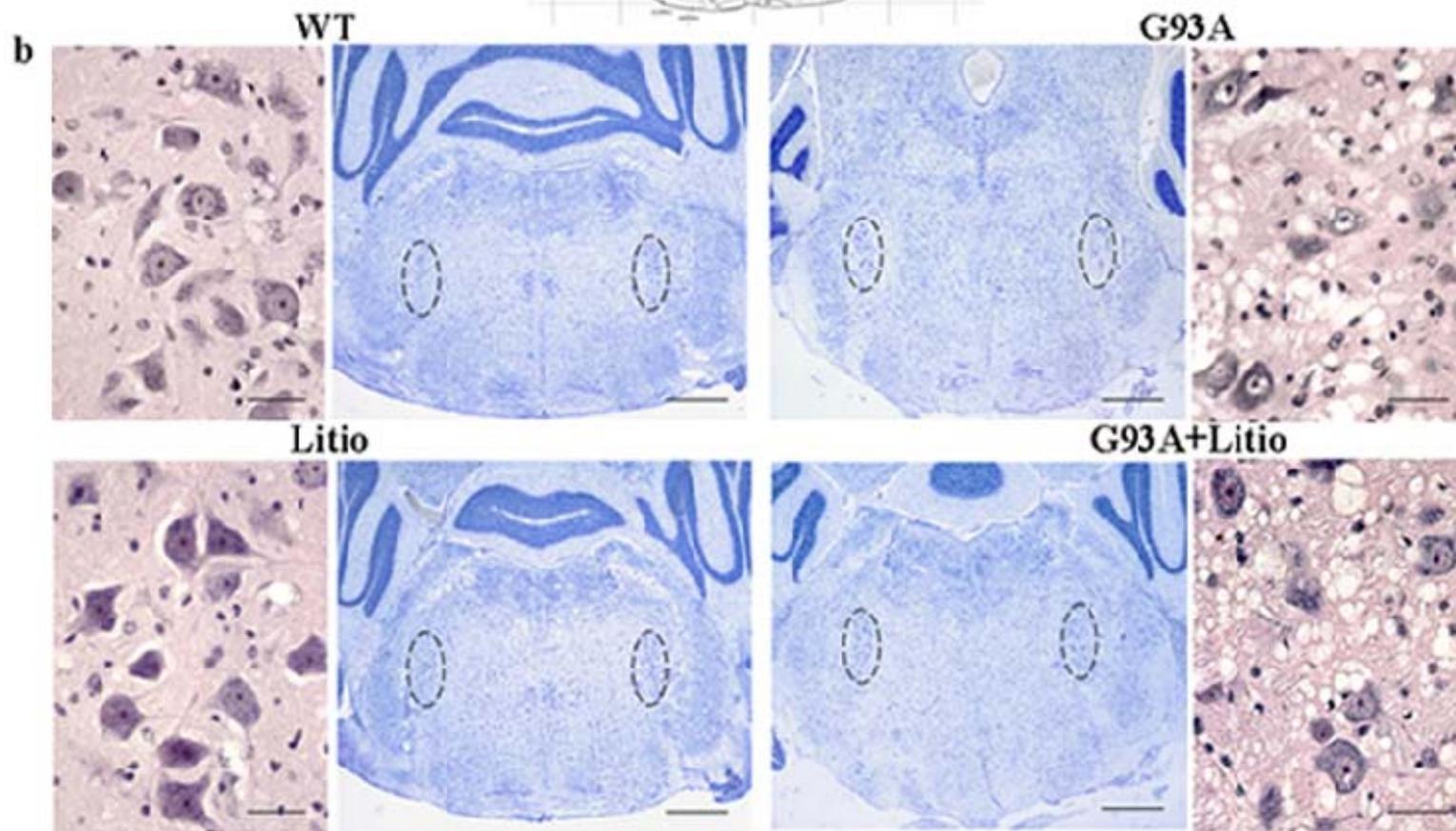
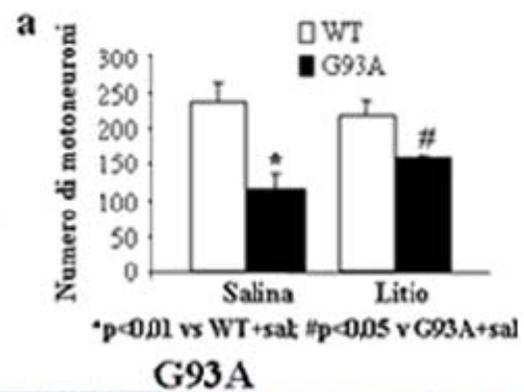
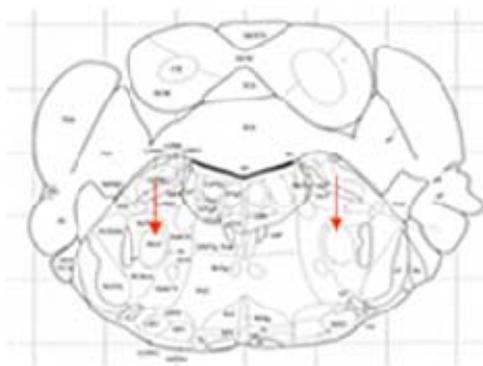


FIGURA 4

Nucleo motore del nervo faciale

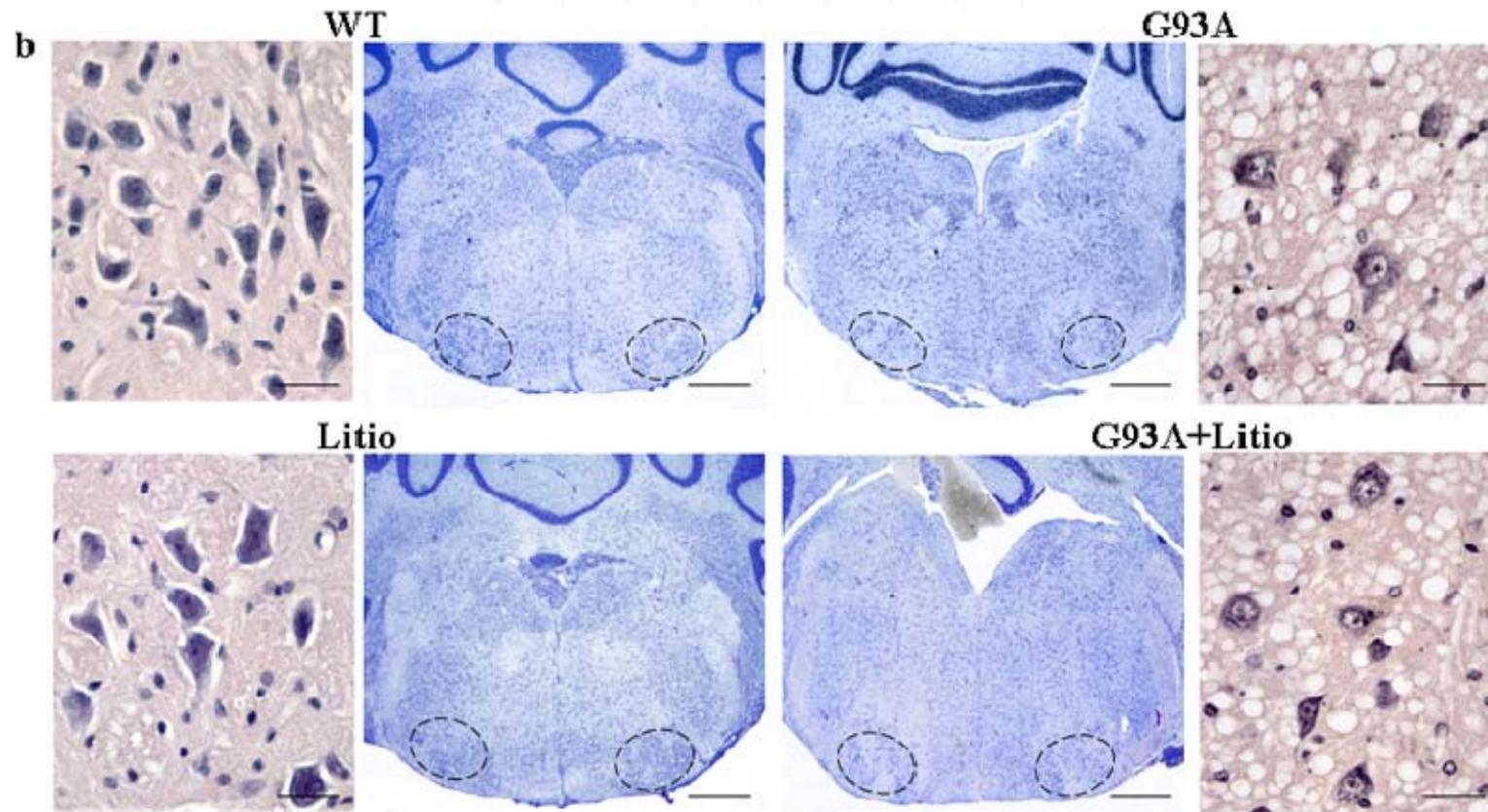
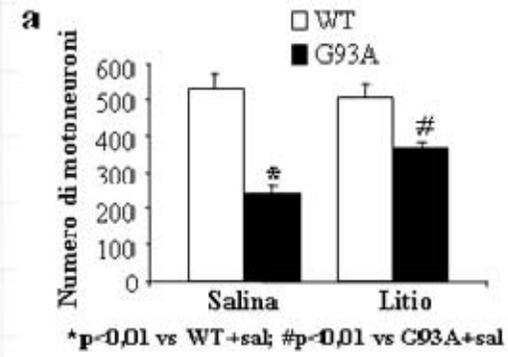
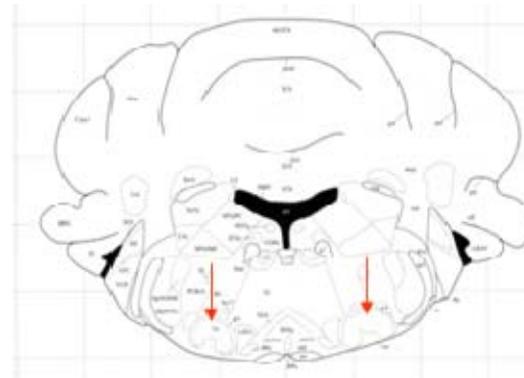


FIGURA 5

Nucleo ambiguo

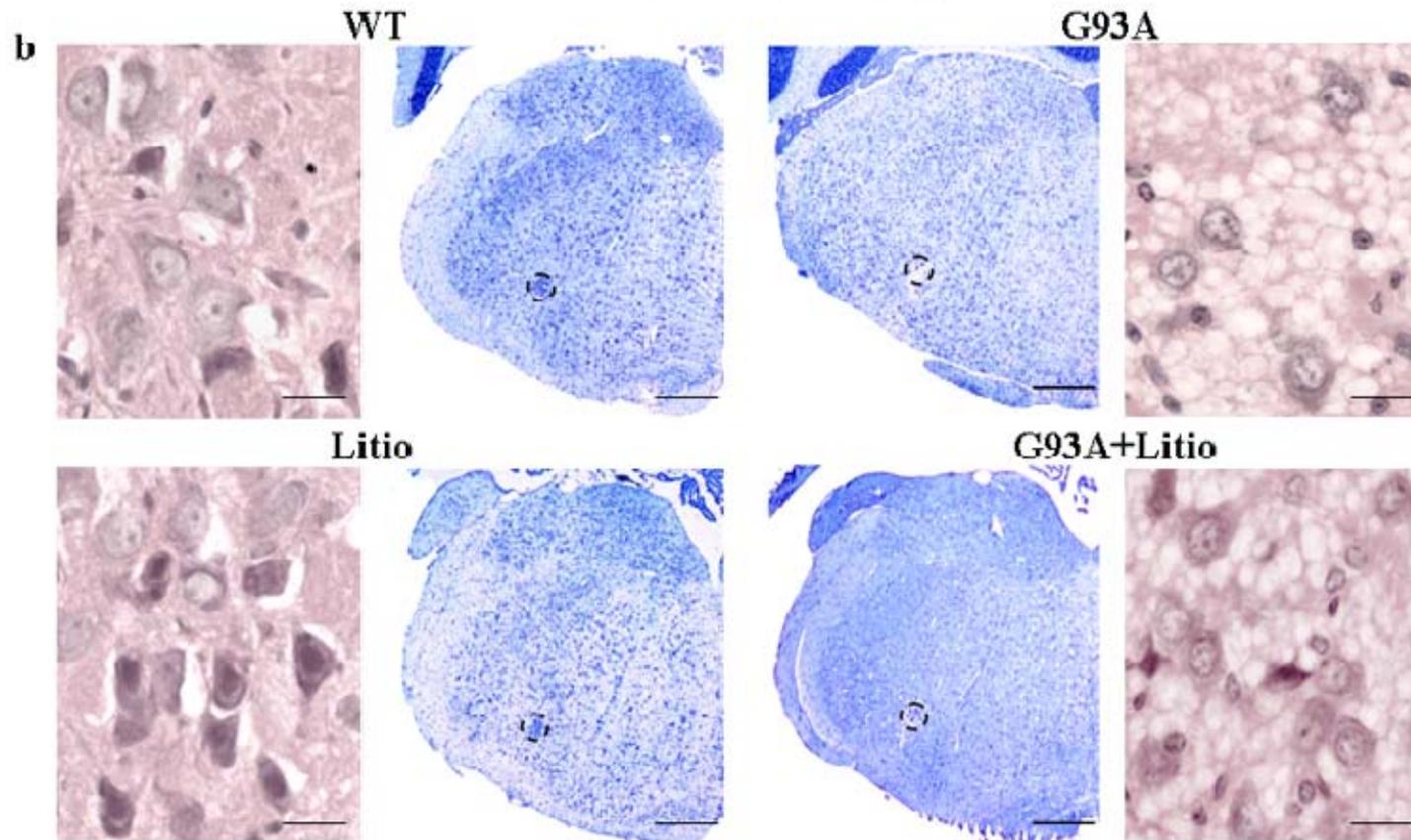
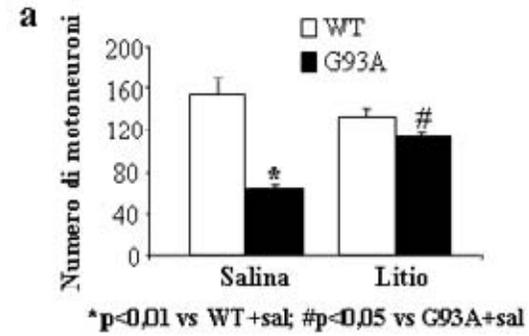
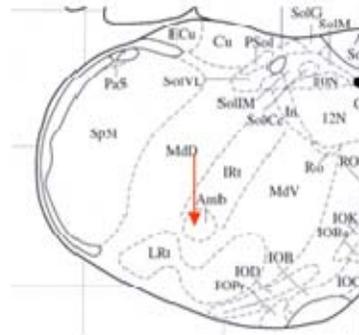


FIGURA 6

Nucleo del nervo ipoglosso

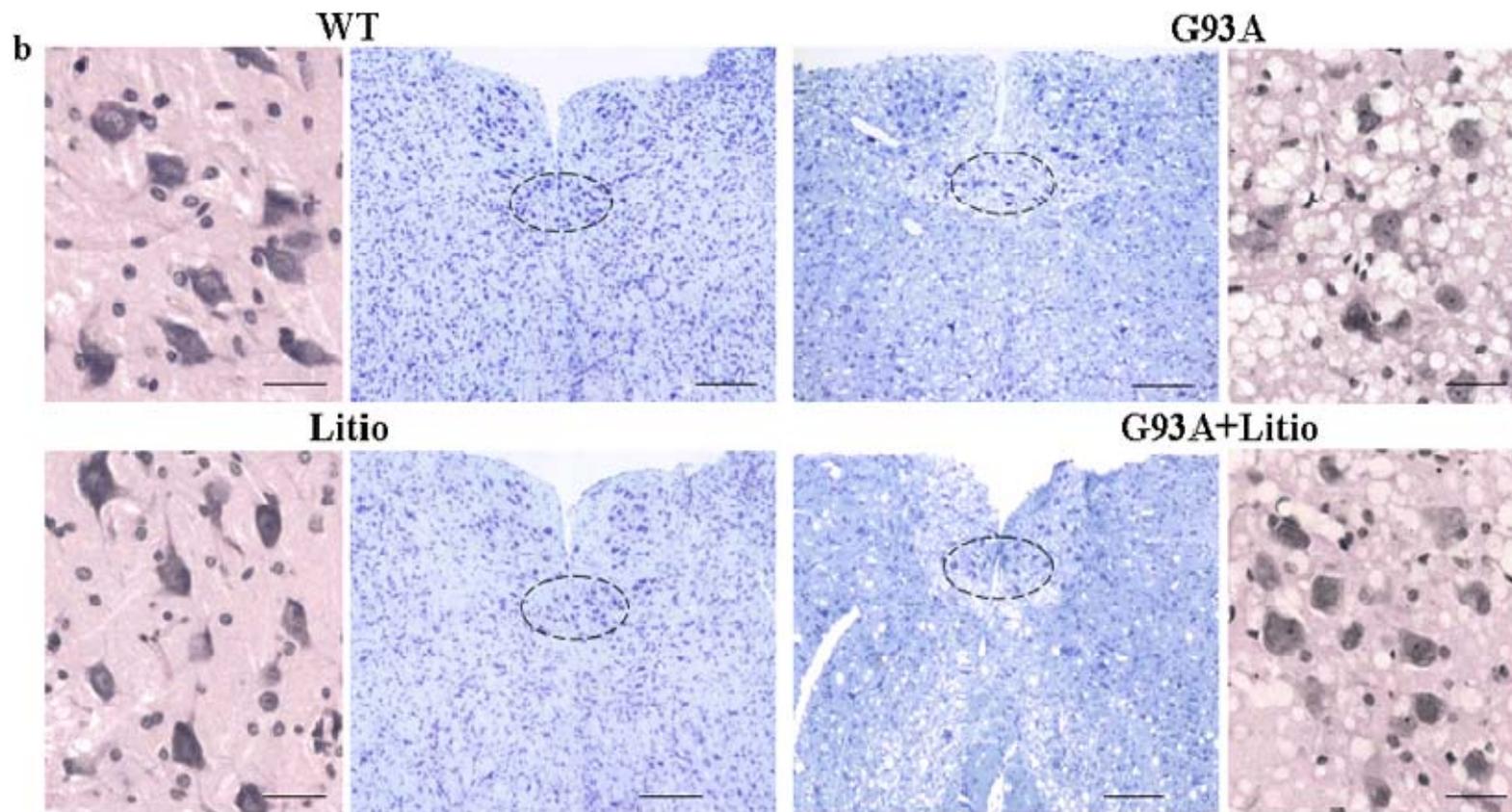
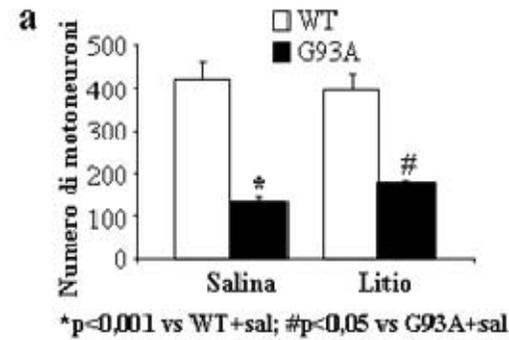
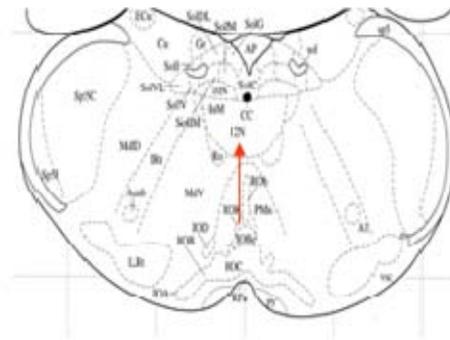


FIGURA 7

**Nucleo motore dorsale
del nervo vago**

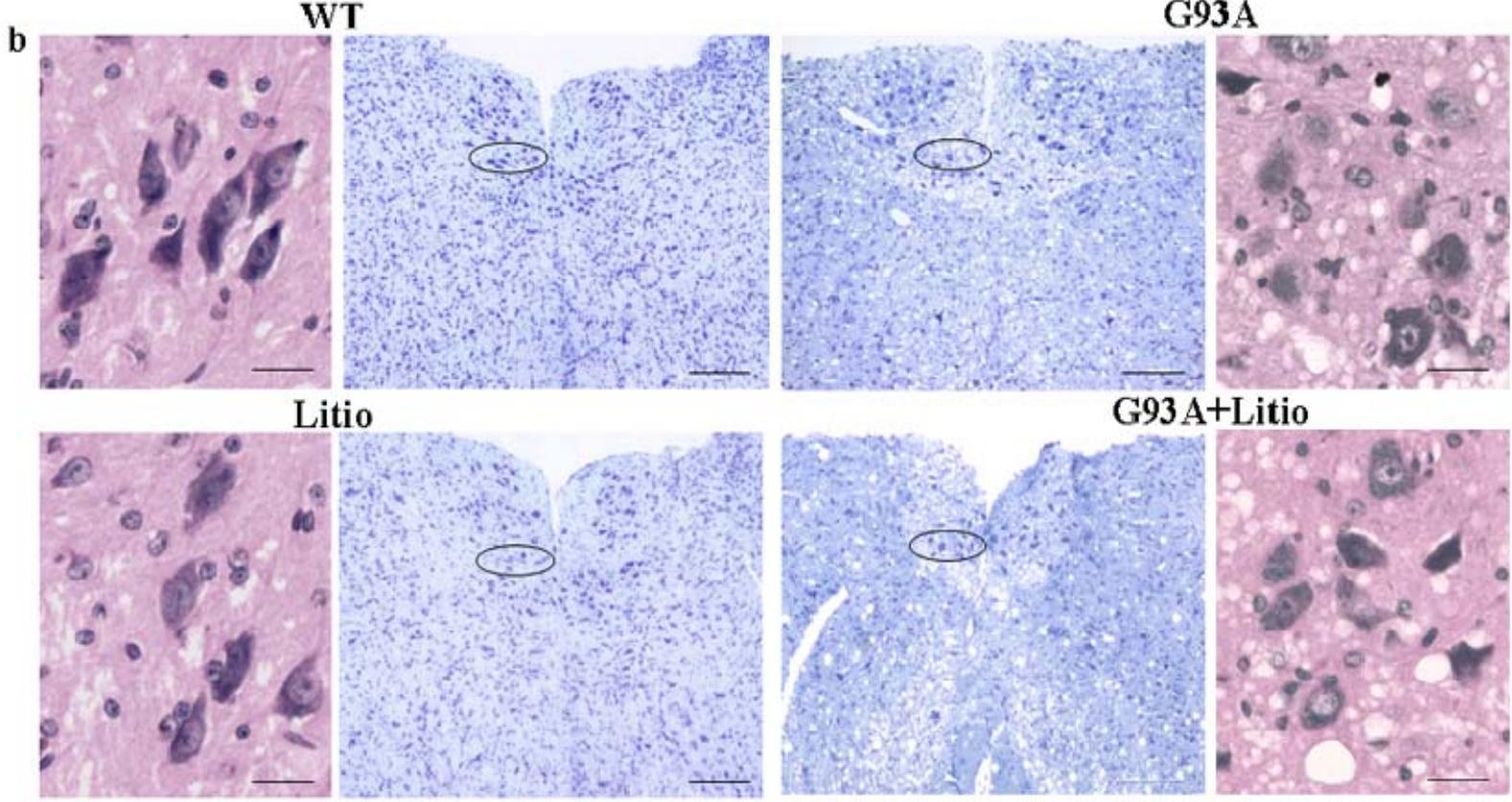
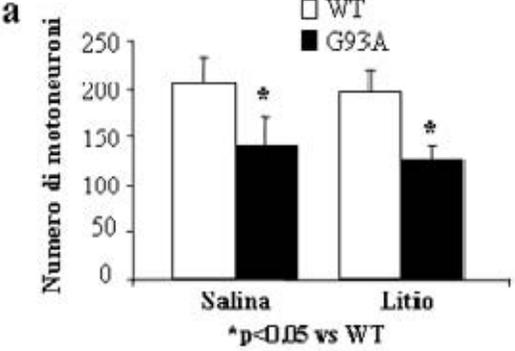
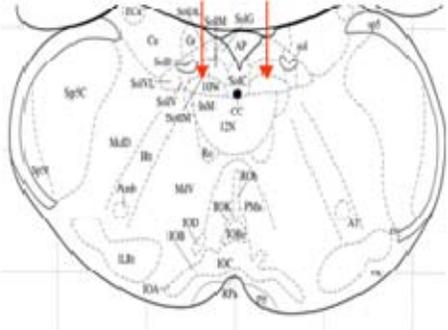


FIGURA 8

Nucleo del nervo oculomotore

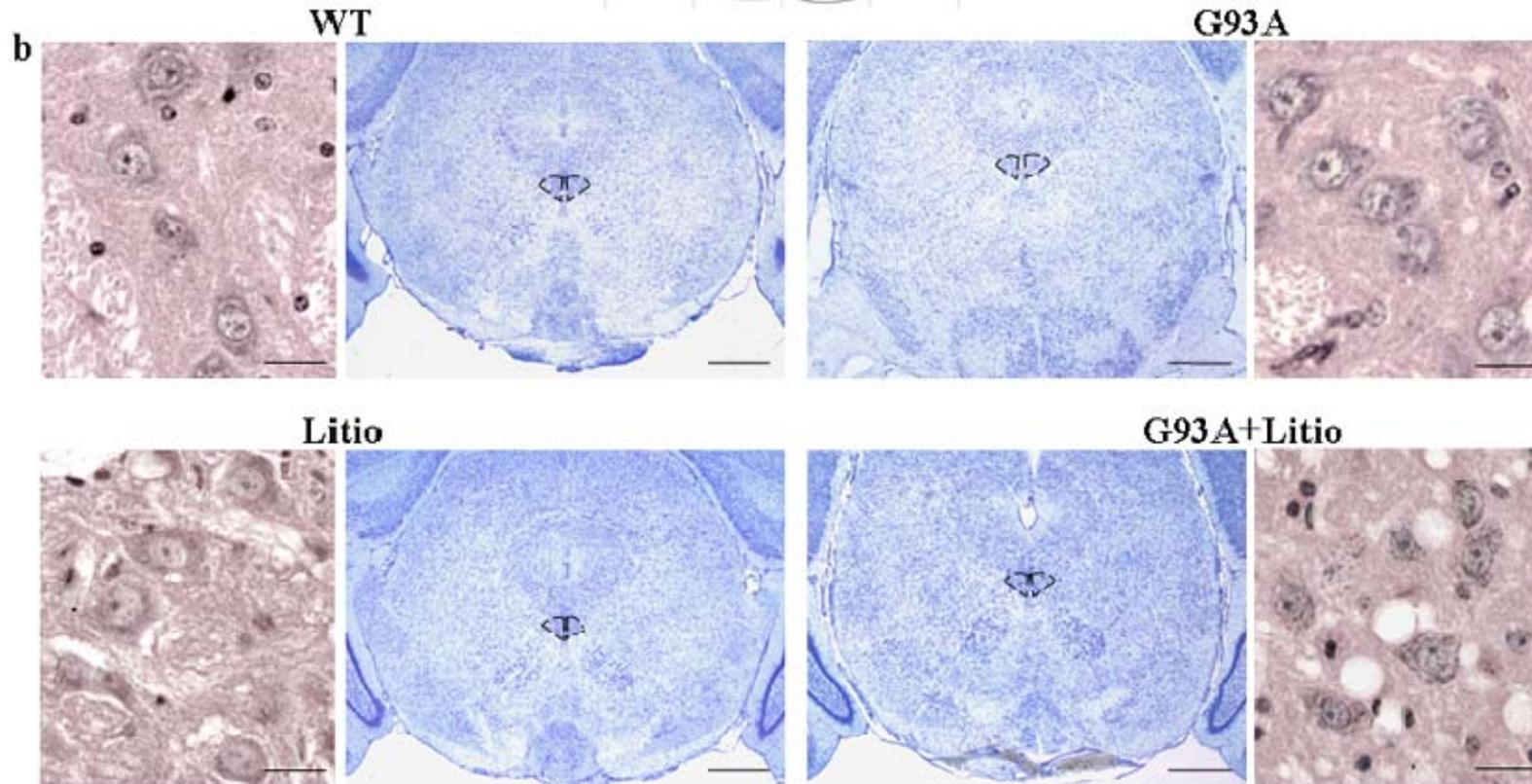
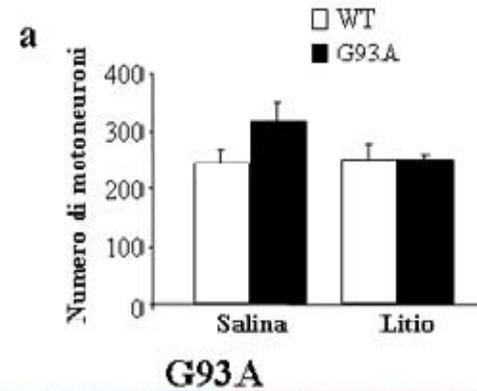


FIGURA 9

Nucleo del nervo trocleare

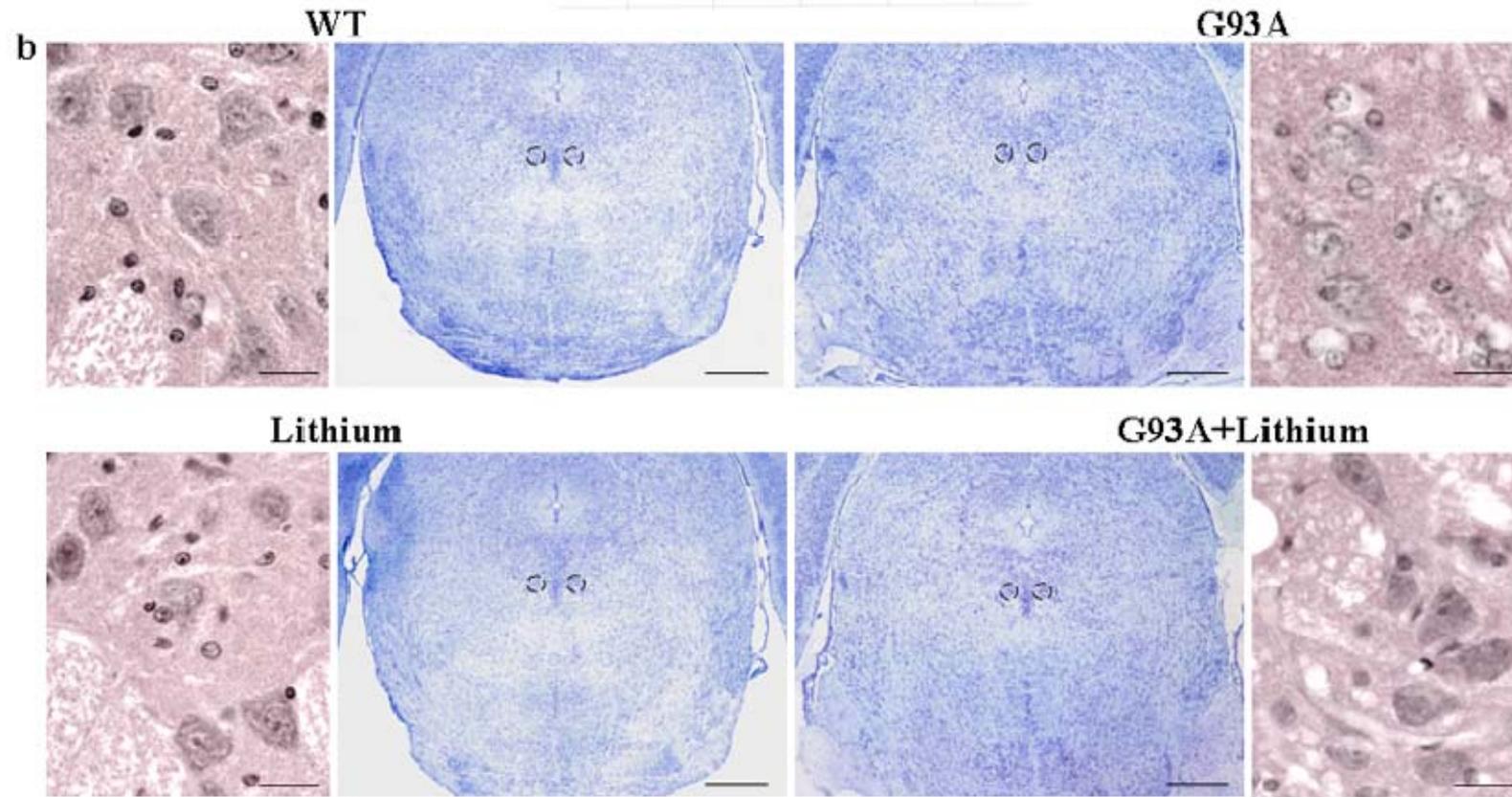
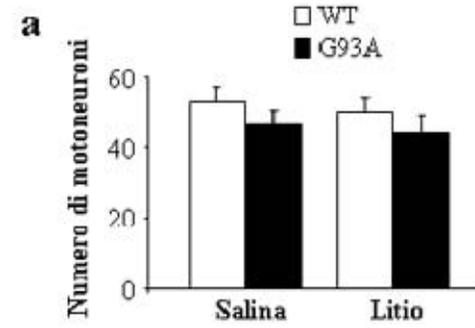
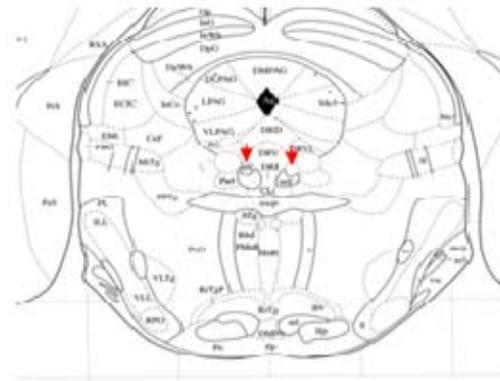


FIGURA 10

Nucleo del nervo abducente

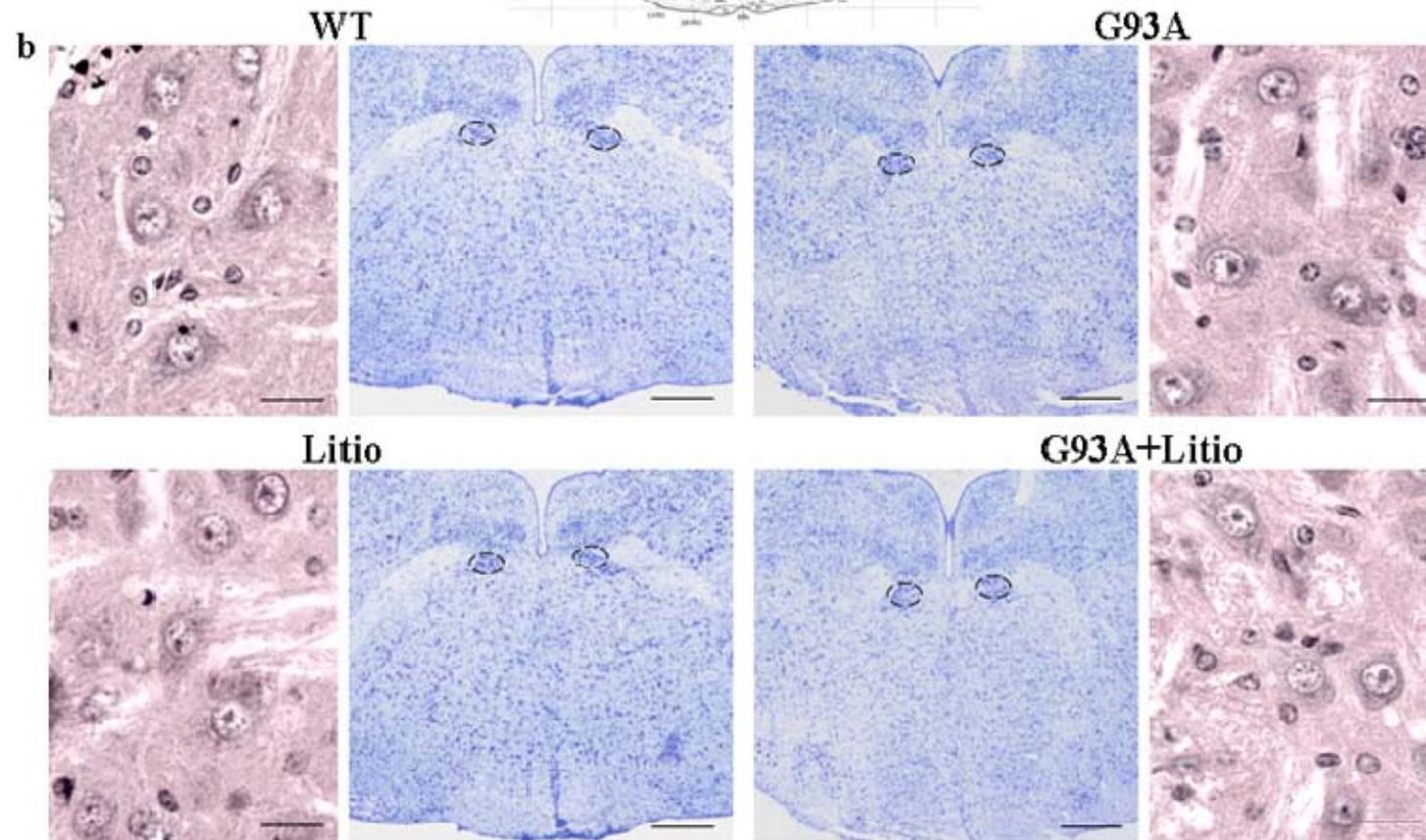
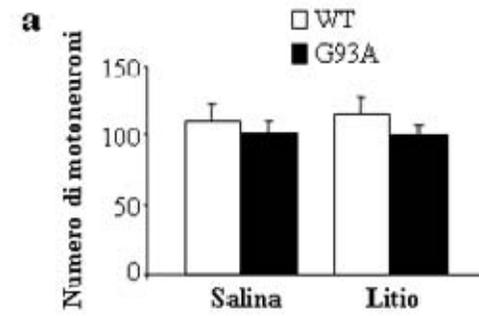
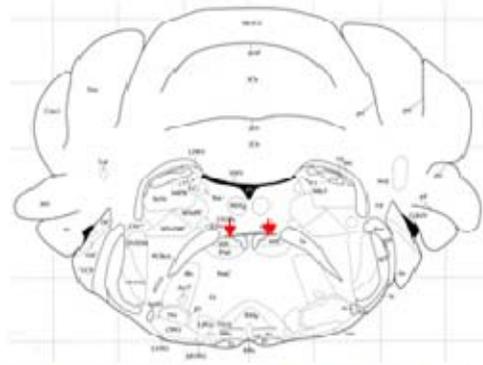


FIGURA 11

Nucleo motore del nervo faciale

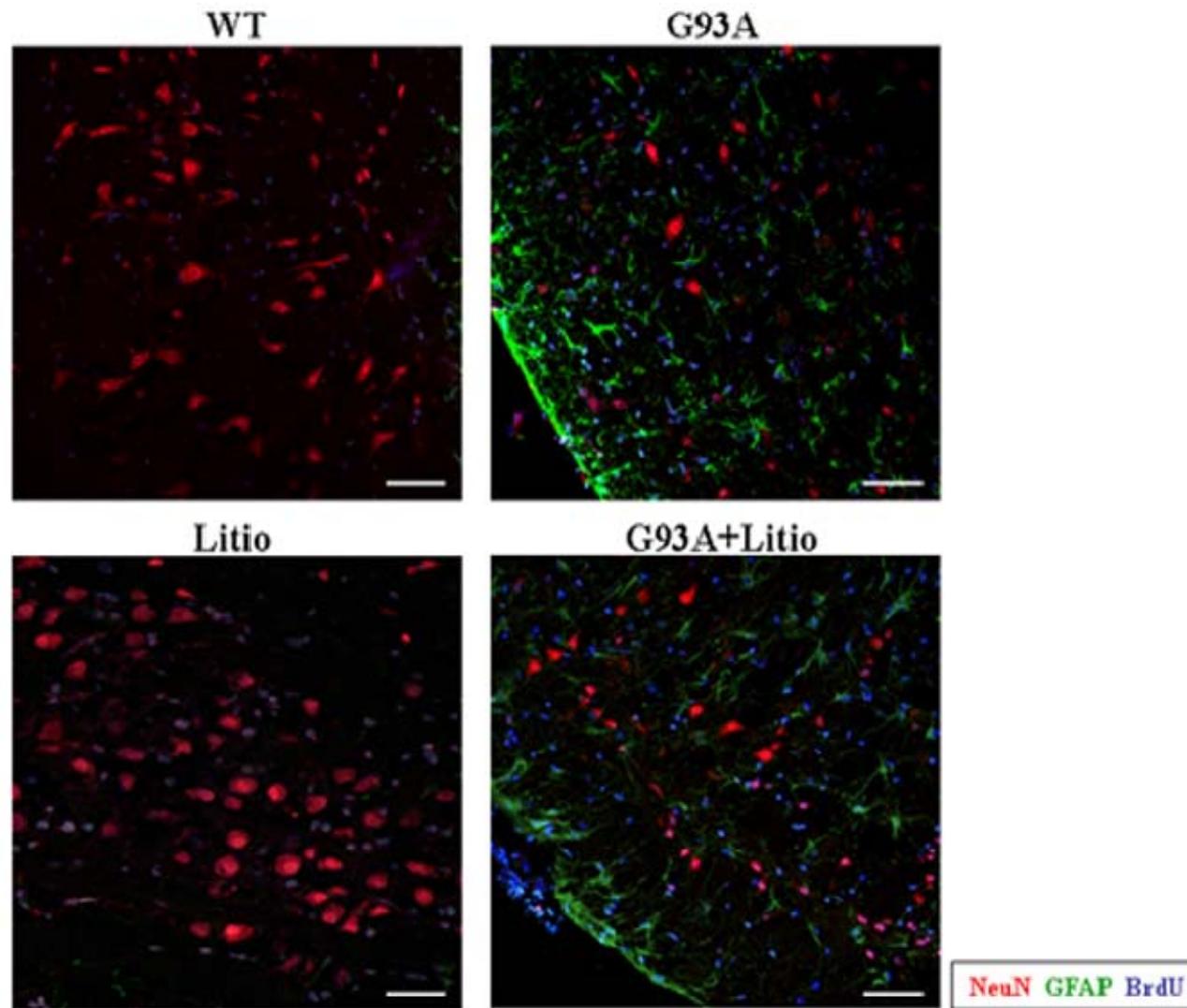


FIGURA 12

Nucleo del nervo ipoglosso

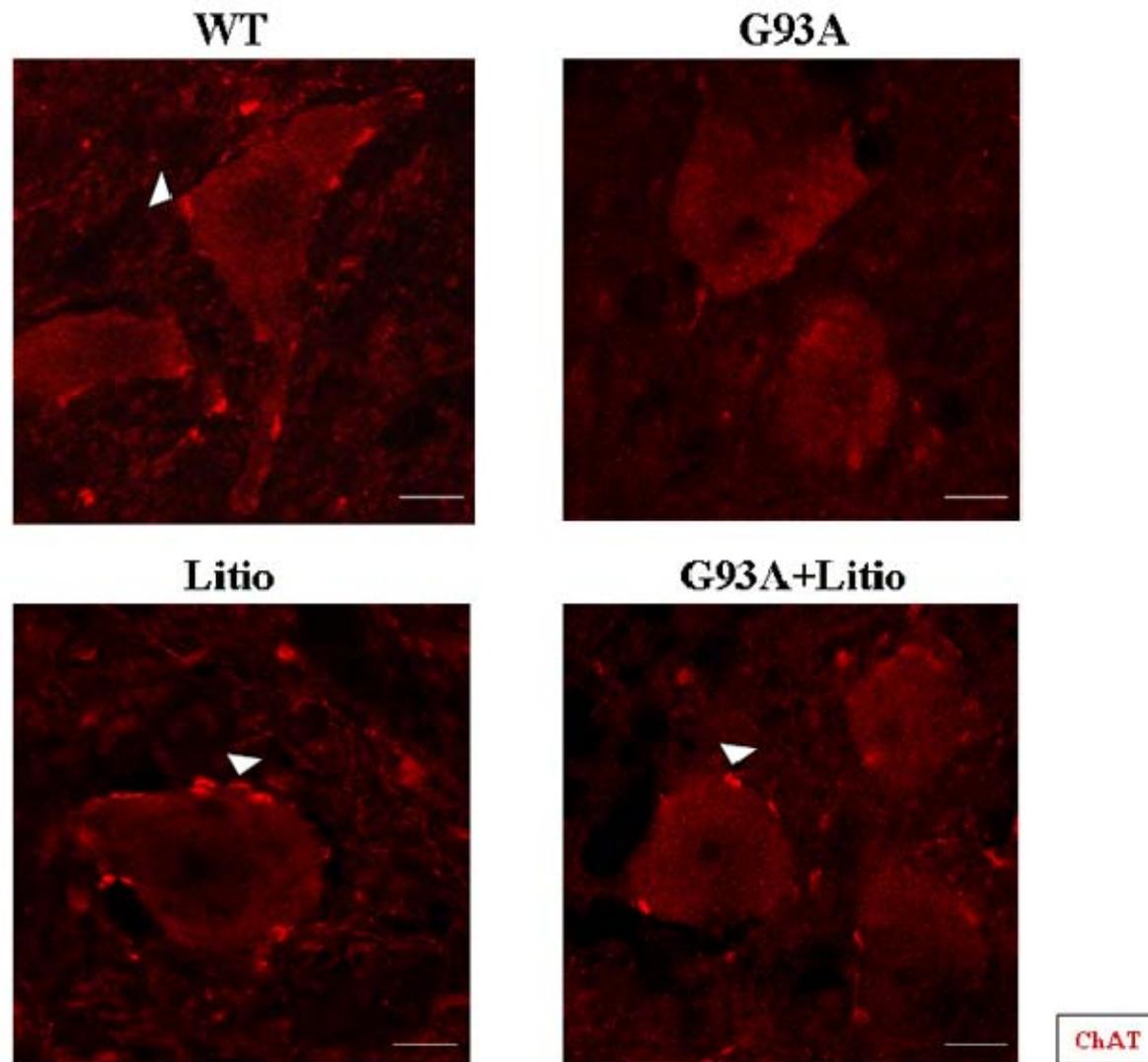


FIGURA 13

LEGENDE

Figura 4. Nucleo motore del nervo trigemino (5N).

Lo schema a fianco del titolo raffigura una sezione dell'atlante del topo Paxinos & Franklin (2004) che mostra la localizzazione del nucleo motore del nervo trigemino.

(a) In grafico sono riportati i risultati relativi alla conta stereologica dei motoneuroni nei vari gruppi. Si osservi il drammatico decremento nel numero dei motoneuroni degli animali G93A trattati con salina e la loro parziale preservazione nei topi G93A trattati con litio.

(b) I dati qualitativi istologici mostrano, a basso ingrandimento (cresyl violetto), una normale densità neuronale nei topi WT trattati con salina o con litio, mentre nei topi G93A trattati con salina si osserva una netta riduzione della popolazione neuronale. In particolare, ad alto ingrandimento (ematossilina-eosina) i pochi neuroni superstiti presentano un citoplasma più diluito, vacuolizzato, e una forma più irregolare. Nei topi G93A trattati con litio la densità neuronale appare maggiore rispetto al trattamento con salina e anche la morfologia neuronale appare preservata.

* $p \leq 0,01$ vs WT+salina, # $p \leq 0,05$ vs G93A+salina.

La barra corrisponde a: 47,05 μm (ematossilina-eosina); 640 μm (cresyl violetto).

Figura 5. Nucleo motore del nervo faciale (7N).

Lo schema a fianco del titolo raffigura una sezione dell'atlante del topo Paxinos & Franklin (2004) che mostra la localizzazione del nucleo motore del nervo faciale.

(a) Le conte stereologiche riportate nel grafico dimostrando la severa perdita di motoneuroni nel nucleo dei topi G93A trattati con salina e la loro parziale preservazione nei topi G93A trattati con litio.

(b) Le colorazioni istologiche con cresyl violetto ed ematossilina-eosina mostrano la severa degenerazione presente nel nucleo faciale dei topi G93A trattati con salina e il normale aspetto istologico dei motoneuroni negli animali WT. Il litio protegge i motoneuroni del nucleo faciale dei topi G93A. Nelle immagini a basso ingrandimento (cresyl violetto) si nota una maggiore densità neuronale nei topi G93A trattati con litio, in contrasto con la marcata riduzione cellulare che caratterizza gli stessi animali trattati con salina. Ad alto ingrandimento (ematossilina-eosina) la morfologia neuronale dei topi G93A trattati con litio appare normale, senza le alterazioni tipiche della degenerazione.

* $p \leq 0,01$ vs WT+salina, # $p \leq 0,01$ vs G93A+salina.

La barra corrisponde a: 40 μm (ematossilina-eosina); 552 μm (cresyl violetto).

Figura 6. Nucleo ambiguo (9/10N).

Lo schema a fianco del titolo raffigura una sezione dell'atlante del topo Paxinos & Franklin (2004) che mostra la localizzazione del nucleo ambiguo.

(a) Il grafico mostra il netto decremento nel numero di neuroni nel nucleo ambiguo dei topi G93A rispetto ai topi WT e il significativo incremento del numero cellulare nei topi G93A in seguito a trattamento con litio rispetto ai G93A trattati con salina.

(b) L'aspetto istologico del nucleo ambiguo appare normale nei topi WT trattati con salina o con litio, mentre si osserva un'estesa degenerazione nei topi G93A trattati con salina (cresyl violetto). Il trattamento con litio dei topi G93A preserva il normale aspetto istologico del nucleo e la morfologia dei motoneuroni; in

particolare, nelle immagini ad alto ingrandimento (ematossilina-eosina) si nota che la vacuolizzazione e la irregolare morfologia che caratterizzano i motoneuroni dei topi G93A trattati con salina sono fortemente attenuate nei topi G93A trattati con litio.

* $p \leq 0,01$ vs WT+salina, # $p \leq 0,05$ vs G93A+salina.

La barra corrisponde a: 40 μm (ematossilina-eosina); 454,4 μm (cresyl violetto).

Figura 7. Nucleo del nervo ipoglosso (12N).

Lo schema a fianco del titolo raffigura una sezione dell'atlante del topo Paxinos & Franklin (2004) che mostra la localizzazione del nucleo motore del nervo ipoglosso.

(a) Nel grafico sono riportati i risultati delle conte cellulari, che mostrano la riduzione del numero di motoneuroni nel nucleo del nervo ipoglosso degli animali G93A trattati con salina e la loro parziale preservazione nei topi G93A trattati con litio.

(b) A basso ingrandimento (cresyl violetto) è ben visibile la severa perdita neuronale nei topi G93A trattati con salina, mentre in seguito a trattamento con il litio la densità neuronale all'interno del nucleo appare maggiore rispetto a quella dei topi G93A trattati con salina. L'effetto protettivo del litio negli animali G93A è evidente anche nelle immagini ad alto ingrandimento (ematossilina-eosina), dove si osserva la preservazione della morfologia neuronale; al contrario, un'estesa vacuolizzazione caratterizza la degenerazione dei motoneuroni dei topi G93A trattati con salina.

* $p \leq 0,001$ vs WT+salina, # $p \leq 0,05$ vs G93A+salina.

La barra corrisponde a: 40 μm (ematossilina-eosina); 444 μm (cresyl violetto).

Figura 8. Nucleo motore dorsale del nervo vago (10N).

Lo schema a fianco del titolo raffigura una sezione dell'atlante del topo Paxinos & Franklin (2004) che mostra la localizzazione del nucleo motore dorsale del nervo vago.

(a) L'analisi stereologica, i cui dati sono riportati in grafico, conferma il decremento nella popolazione neuronale del nucleo dorsale del vago di tutti i topi G93A: il trattamento con litio, infatti, non modifica l'entità della degenerazione dovuta alla malattia.

(b) Nelle immagini in cresyl violetto (basso ingrandimento), si osserva la marcata depauperazione cellulare nei topi G93A sia trattati con salina che con litio; ad alto ingrandimento (ematossilina-eosina) i neuroni superstiti appaiono sofferenti, di forma irregolare e con citoplasma vacuolizzato.

* $p \leq 0,05$ vs WT.

La barra corrisponde a: 40 μm (ematossilina-eosina); 444 μm (cresyl violetto).

Figura 9. Nucleo del nervo oculomotore (3N).

Lo schema a fianco del titolo raffigura una sezione dell'atlante del topo Paxinos & Franklin (2004) che mostra la localizzazione del nucleo oculomotore.

(a) Dalla conta stereologica risulta che il nucleo oculomotore è risparmiato dalla degenerazione nei topi G93A. I dati riportati in grafico dimostrano infatti la preservazione del nucleo oculomotore dalla degenerazione in tutti gli animali transgenici analizzati, che possiedono un numero di motoneuroni paragonabile a quello dei topi WT.

(b) Le colorazioni istochimiche mostrano che la densità (cresyl violetto) e la morfologia (ematossilina-eosina) neuronali nel nucleo oculomotore dei topi G93A

trattati con salina appaiono non dissimili da quella dei topi WT. Il trattamento con litio dei topi G93A non modifica tali caratteristiche.

La barra corrisponde a: 40 μm (ematossilina-eosina); 640 μm (cresyl violetto).

Figura 10. Nucleo del nervo trocleare (4N)

Lo schema a fianco del titolo raffigura una sezione dell'atlante del topo Paxinos & Franklin (2004) che mostra la localizzazione del nucleo del nervo trocleare.

(a) Dalle conte stereologiche mostrate in grafico non emerge nessun cambiamento significativo nel numero di motoneuroni del nucleo del nervo trocleare negli animali transgenici (G93A trattati con salina o con litio) rispetto ai WT.

(b) Anche l'aspetto istologico del nucleo appare invariato nei topi transgenici rispetto ai WT. In particolare, negli animali G93A la densità (cresyl violetto) e la morfologia (ematossilina-eosina) dei neuroni appaiono preservate, senza le tipiche alterazioni che caratterizzano i motoneuroni dei nuclei lesi.

La barra corrisponde a: 40 μm (ematossilina-eosina); 516 μm (cresyl violetto).

Figura 11. Nucleo del nervo abducente (6N).

Lo schema a fianco del titolo raffigura una sezione dell'atlante del topo Paxinos & Franklin (2004) che mostra la localizzazione del nucleo motore del nervo abducente.

(a) Le conte stereologiche mostrate in grafico dimostrano la preservazione del nucleo del nervo abducente in tutti i topi G93A, dove il numero di motoneuroni è paragonabile a quello contato negli animali WT.

(b) Le immagini in cresyl violetto (basso ingrandimento) ed ematossilina-eosina (alto ingrandimento) confermano i dati stereologici. Infatti, non sono state rilevate differenze significative nella densità neuronale e nelle caratteristiche morfologiche

dei motoneuroni del nucleo abducente nei topi transgenici, trattati con salina o con litio, rispetto agli animali WT.

La barra corrisponde a: 28,57 μm (ematossilina-eosina); 413,6 μm (cresyl violetto).

Figura 12. Tripla immunofluorescenza per NeuN, GFAP e BrdU nel nucleo motore del nervo faciale (7N).

Sono mostrate in rosso la marcatura per il NeuN, in verde per la GFAP, in blu per la BrdU. L'immunofluorescenza per la GFAP è marcatamente aumentata nei topi G93A trattati con salina ed è accompagnata da una significativa riduzione della marcatura per il NeuN, che è consistente con la perdita neuronale documentata dalla conta stereologica e dall'analisi istologica. Il trattamento con litio dei topi G93A riduce l'immunomarcatura per la GFAP e, consistentemente con i dati istologici, aumenta la marcatura per il NeuN. L'immunopositività per la BrdU appare aumentata in tutti i topi G93A. Tuttavia, solo nei topi G93A trattati con litio la marcatura per la BrdU co-localizza con il NeuN in alcuni neuroni del nucleo, che appaiono rosa come risultato del "merge".

La barra corrisponde a 53,33 μm .

Figura 13. Immunofluorescenza per la ChAT nel nucleo del nervo ipoglosso (12N).

L'immunofluorescenza per la ChAT mostra la normale distribuzione dei bottoni sinaptici (freccia) sui motoneuroni del nucleo del nervo ipoglosso dei topi WT e la loro drastica riduzione nei topi G93A trattati con salina.

Nei topi G93A trattati con litio la densità dei bottoni sinaptici appare preservata.

La barra corrisponde a: 16,67 μm .

DISCUSSIONE

Nel corso di questo studio è stata condotta una dettagliata analisi dei nuclei motori del tronco dell'encefalo nel topo transgenico G93A, che iperesprime una forma mutata del gene umano che codifica per l'enzima SOD1 e viene utilizzato comunemente come modello di SLA familiare.

Il topo G93A rappresenta infatti un modello animale ampiamente studiato in quanto rappresentativo della malattia umana, sia nella sintomatologia che nelle alterazioni neuropatologiche (Dal Canto and Gurney, 1994; 1995). I sintomi motori, imputabili per la maggior parte a lesioni del midollo spinale, appaiono molto precocemente, intorno al terzo o quarto mese di vita, e progrediscono rapidamente fino alla completa paralisi (stato tetraplegico; Gurney et al., 1994; Ripps et al., 1995; Gurney, 1997a; 1997b). La morte sopraggiunge solitamente per inedia, dovuta all'incapacità dell'animale di nutrirsi e idratarsi adeguatamente. Recentemente anche nel modello murino è stato documentato un rapido declino della funzionalità respiratoria (Tankersley et al., 2007) che riproduce le complicanze respiratorie che sopraggiungono nei pazienti all'ultimo stadio di malattia (Tandan e Bradley, 1985; Kaplan e Hollander 1994; Miller et al., 1999b; Cleveland e Rothstein 2001).

In linea con la prevalente sintomatologia spinale manifestata da questi topi transgenici, le lesioni centrali principalmente descritte nel topo G93A sono a livello midollare (Morrison et al., 1998; Martin et al., 2007; Fornai et al., 2008a). Tuttavia, nei pazienti SLA, oltre a tipici disturbi di origine spinale, si descrivono anche gravi disfunzioni motorie riconducibili a lesioni più craniali, che coinvolgono il tronco encefalico e la corteccia motoria.

L'analisi di tutti i nuclei motori dei nervi encefalici, condotta in questo studio in maniera estensiva e completa in microscopia ottica, ha avuto come principale obiettivo quello di caratterizzare la neuropatologia del modello murino a livelli craniali rispetto al midollo spinale. La conta neuronale ha dimostrato che i motoneuroni di tutti i nuclei motori dei nervi encefalici, ad eccezione dei nuclei oculomotori, degenerano in maniera simile ai motoneuroni del corno anteriore del midollo spinale, riproducendo così ciò che avviene nella patologia umana.

La degenerazione coinvolge i motoneuroni somatici del nucleo motore del nervo trigemino (5N), del nucleo del nervo faciale (7N), del nucleo del nervo ipoglosso (12N) e del nucleo ambiguo (9N/10N) e si estende ai neuroni effettori del nucleo motore dorsale del vago (10N). In questi nuclei, i motoneuroni superstiti mostrano un'estesa vacuolizzazione citosolica. Alla perdita dei motoneuroni si accompagna un'intensa proliferazione gliale.

In questo studio è stato inoltre dimostrato che il trattamento cronico con sali di litio è protettivo per tutti i nuclei lesi: in particolare il litio protegge significativamente i motoneuroni dalla degenerazione, preserva la loro normale morfologia e riduce la gliosi reattiva.

Pertanto, possiamo affermare che il topo transgenico G93A rappresenta un buon modello sperimentale di SLA in quanto riproduce, anche a livello del tronco dell'encefalo, le alterazioni anatomo-patologiche descritte nella patologia umana (Lladó et al., 2006; Niessen et al., 2006; Tankersley et al., 2007; Lever et al., 2009). In particolare, soprattutto la forma bulbare della malattia è caratterizzata da difficoltà nell'ingestione di cibo e di liquidi (Hillel e Miller 1987; Tayama, 1995; Kawai et al., 2003). La perdita di queste funzioni è dovuta in gran parte alla paralisi progressiva dei muscoli coinvolti nella masticazione e dei muscoli della lingua, probabilmente come conseguenza della degenerazione dei motoneuroni dei

nuclei motori del tronco dell'encefalo e delle corrispondenti fibre efferenti dei nervi encefalici che innervano i muscoli masticatori (nucleo motore del nervo trigemino) e quelli coinvolti nella deglutizione (nucleo del nervo ipoglosso, nucleo ambiguo) (Hillel e Miller 1989).

Dal presente studio è emerso che tra i nuclei motori del tronco dell'encefalo, il nucleo del nervo ipoglosso e il nucleo ambiguo sono maggiormente compromessi, con una degenerazione neuronale del 68,69% e del 58,92%, rispettivamente. Tali risultati sono in accordo a quelli ottenuti anche in altri recenti studi, i quali hanno dimostrato che i nuclei motori coinvolti nella masticazione e nella deglutizione vanno incontro ad una severa degenerazione, caratterizzata da una evidente vacuolizzazione, che porta questi animali a sviluppare disfagia in maniera simile a quanto avviene nei pazienti affetti da SLA (Lever et al., 2009).

Gli altri nuclei motori somatici, come quelli del nervo faciale e del nervo trigemino mostrano una degenerazione meno pronunciata, sebbene significativa, pari al 54,92% e al 50,28%, rispettivamente. Questi dati sono in accordo con altri studi che hanno esaminato tali nuclei nello stesso modello animale (Dal Canto e Gurney 1995; Haenggeli e Kato, 2002; Angenstein et al., 2004; Zang et al., 2004; Kadoyama et al., 2007).

Il nucleo del nervo ipoglosso contiene i motoneuroni che innervano i muscoli della lingua. Il nucleo ambiguo da cui originano le fibre motorie somatiche che decorrono nel nervo glossofaringeo e nel nervo vago, è un nucleo fondamentale per l'innervazione motoria dei muscoli orofaringei, nonché del primo tratto dell'esofago, caratterizzato da muscolatura volontaria. Pertanto, la perdita di motoneuroni nel nucleo del nervo ipoglosso e nel nucleo ambiguo e la degenerazione del nervo trigemino rendono conto dei problemi nella deglutizione

ben documentati sia nel modello murino (Smittkamp et al., 2008; Lever et al., 2009) che nella patologia umana (Hillel e Miller, 1989; Kawai et al., 2003)

La compromissione del nucleo motore del nervo faciale potrebbe avere ripercussione sull'attività di muscoli come il muscolo nasolabiale, il muscolo mentale, il muscolo platisma, i muscoli auricolari rostrale e caudale (Komiya et al., 1984). Sebbene non esistano test comportamentali atti a valutare l'attività di tali muscoli nel topo, il coinvolgimento di tale nucleo è comunque confermato nella patologia umana, in cui negli stadi avanzati di malattia si assiste a una drammatica perdita delle funzioni dei muscoli innervati dalla componente motoria del VII nervo cranico (Preston et al., 1997).

Nel nostro studio la degenerazione dei motoneuroni del tronco dell'encefalo è stata trovata in maniera altamente specifica soltanto nei nuclei motori somatici del 5, 7, 9-10 e 12N, mentre non è stata mai osservata all'interno dei nuclei dei nervi cranici preposti al controllo dei muscoli estrinseci del bulbo oculare, vale a dire l'oculomotore (3N), il trocleare (4N) e l'abducente (6N). La preservazione dei nuclei oculomotori osservata nel nostro studio trova conferma in letteratura nel topo G93A, dove non vengono riportate alterazioni morfologiche cellulari né riduzioni nel numero dei motoneuroni (Nimchinsky et al., 2000; Haenggeli e Kato 2002). Lo stesso fenomeno in questo modello animale è stato descritto grazie all'utilizzo di tecniche di imaging in risonanza magnetica (MRI; Zang et al., 2004). Si tratta di un metodo non invasivo che sta diventando uno strumento preferenziale di diagnosi di SLA, in quanto è in grado di rivelare con buona specificità alterazioni neuropatologiche nel sistema nervoso centrale di pazienti affetti dalla malattia (Ellis et al., 1999; Ellis et al., 2001; Basak et al., 2002) e da qualche anno introdotto anche negli studi sperimentali su piccoli animali.

Sebbene sia documentato un esiguo numero di casi di oftalmoplegia e di riduzione del numero di motoneuroni nei nuclei oculomotori di pazienti affetti da SLA, i nuclei oculomotore, trocleare e abducente non sono notoriamente coinvolti nella SLA umana e i movimenti oculomotori sono mantenuti almeno fino allo stadio finale della malattia (Harvey et al., 1979; Leveille et al., 1982; Leigh e Swash, 1991; Gizzi et al., 1992; Okamoto et al., 1993; Rowland, 1994).

Nonostante non sia da escludere l'ipotesi che i nuclei oculomotori siano coinvolti solo in uno stadio molto tardivo della malattia e che appaiano preservati solo perché la morte sopraggiunge prima che la loro degenerazione diventi manifesta, è comunque evidente che essi rappresentano un pool di motoneuroni dotati di una maggiore resistenza ai processi degenerativi in atto nella SLA. Il meccanismo alla base di questa selettiva resistenza non è chiaro, anche se vari studi hanno dimostrato che una proteina che lega il calcio, la parvalbumina, è particolarmente rappresentata nei neuroni dei nuclei che non vengono coinvolti nella SLA e si ritrova in quelle strutture del tronco encefalico che sono interessate in misura minore dal processo degenerativo (Alexianu et al., 1994; Elliot e Snider, 1995; Reiner et al., 1995). In effetti, è stato dimostrato che nel primate l'85-100% dei motoneuroni nei nuclei oculomotori contengono parvalbumina, mentre solo il 20-30% dei neuroni nel nucleo motore del trigemino, nel nucleo del faciale e dell'ipoglosso mostrano immunopositività per questa proteina (Reiner et al., 1995). In linea con ciò, un recente studio ha dimostrato che i neuroni del nucleo ipoglosso possiedono una scarsa capacità di tamponare gli eccessi di ioni calcio (von Lewinski et al., 2008).

Altri studi condotti da Sasaki e coll. hanno dimostrato che nel tronco dell'encefalo i nuclei oculomotore e abducente, che appaiono preservati nei topi G93A,

esprimono un'alta immunopositività per la calbindina D 28k e per la parvalbumina, (Sasaki et al., 2006).

La funzione di queste due proteine in relazione alla patogenesi della SLA deve ancora essere chiarita, tuttavia non è azzardato ritenere che la loro presunta funzione protettiva sia dovuta proprio al loro ruolo di proteine in grado di legare e tamponare l'eccesso di calcio intracellulare, proteggendo le cellule dal danno eccitotossico (Mattson et al., 1991; Lledo et al., 1992; Chard et al., 1993).

I livelli di calcio intracellulare giocano un ruolo molto importante nella neurodegenerazione e correlano con il grado di degenerazione dei motoneuroni nei topi che esprimono la SOD mutata (Siklós et al., 1998).

Alla luce di questi dati, è lecito ipotizzare che le cellule che contengono proteine in grado di tamponare alti livelli di calcio intracellulare come la calbindina e la parvalbumina siano meno vulnerabili ai processi patologici associati alla SLA e che, pertanto, tali proteine svolgano un ruolo importante nel proteggere i motoneuroni dalla degenerazione.

Un dato interessante emerso dal nostro studio riguarda la degenerazione del nucleo motore dorsale del nervo vago nel topo G93A; tale compromissione dimostra infatti l'effetto della malattia non solo sui nuclei motori somatici dei nervi cranici, ma anche su un nucleo effettore viscerale e potrebbe essere alla base delle disfunzioni autonome descritte nei pazienti affetti da SLA, come l'alterata regolazione delle funzioni cardiovascolari e gastrointestinali (Baltadzhieva et al., 2005). La compromissione del nucleo motore dorsale del vago è stata documentata anche in un altro studio, in cui sono stati rilevati all'immunoistochimica accumuli di SOD1 nei neuroni di questo nucleo in topi G93A allo stadio sintomatico (Chung et al., 2003).

Un altro aspetto che abbiamo indagato in questo studio è stato l'effetto del trattamento cronico con sali di litio sui motoneuroni del tronco encefalico nel topo G93A. Dopo un'attenta analisi stereologica, possiamo concludere che il trattamento con litio si è rivelato protettivo nei confronti dei motoneuroni dei nuclei motori del tronco encefalico, preservandoli dalla degenerazione cui vanno inesorabilmente incontro con il progredire della malattia.

Tale effetto protettivo del litio sui motoneuroni dei nuclei dei nervi encefalici riproduce quanto dimostrato precedentemente in un analogo studio condotto nel midollo spinale del topo transgenico G93A (Fornai et al., 2008a). In particolare, abbiamo dimostrato che nel midollo spinale del topo G93A il trattamento con litio è in grado di produrre effetti protettivi di entità diversa nei diversi tratti del midollo spinale, a loro volta interessati da un diverso grado di degenerazione. Infatti, nel tratto lombare, che è risultato essere maggiormente colpito dalla perdita di motoneuroni, l'effetto protettivo del litio è consistito nella preservazione delle dimensioni e della morfologia dei motoneuroni, senza alcun effetto sul numero dei motoneuroni, mentre nel tratto cervicale, interessato in misura minore dalla degenerazione motoneuronale, l'effetto del trattamento con litio è consistito anche in una significativa preservazione del numero dei motoneuroni rispetto agli animali non trattati (Fornai et al., 2008a).

Recentemente è stato scoperto che il litio, somministrato a basse dosi, è un potente attivatore della via autofagica (Sarkar et al., 2005) attraverso l'inibizione dell'IMPasi. In questo contesto sperimentale non è stata indagata la via autofagica, tuttavia il suo coinvolgimento nella SLA è stato dimostrato nel nostro precedente studio condotto nel midollo spinale del topo G93A, dove i cambiamenti morfologici e ultrastrutturali riscontrati nei motoneuroni spinali preservati suggeriscono fortemente che il meccanismo con cui il litio esplica la sua potente

azione protettiva sia l'attivazione della via autofagica (Fornai et al., 2008a; 2008b). Infatti il litio, somministrato a basse dosi, si è rivelato in grado di rallentare la progressione della malattia, favorendo la rimozione degli aggregati proteici, riducendo le alterazioni e lo swelling mitocondriale e inducendo la mitocondriogenesi, effetti riconducibili all'attivazione della via autofagica (Fornai et al., 2008a; 2008b).

Diversamente, nel tronco dell'encefalo il litio protegge i motoneuroni dalla degenerazione preservando non solo la normale morfologia ma anche il numero di motoneuroni nei nuclei lesi dalla malattia (Fornai et al., 2008a). Rispetto ai topi G93A trattati con salina, i topi G93A trattati con litio presentano una significativa preservazione dei motoneuroni che raggiunge la percentuale del 79,05% nel nucleo ambiguo, del 53,41% nel nucleo motore del facciale, del 37,03% nel nucleo dell'ipoglosso e del 34,66% nel nucleo motore del trigemino.

Un singolare effetto che abbiamo osservato in seguito alla somministrazione di litio riguarda la preservazione dei bottoni sinaptici sui motoneuroni del nucleo ipoglosso. In particolare abbiamo indagato, in questo nucleo, le afferenze positive per la ChAT, che possono rappresentare le terminazioni di collaterali ricorrenti sullo stesso motoneurone oppure afferenze modulatorie colinergiche provenienti da altri neuroni. Nei topi G93A i bottoni sinaptici ChAT-positivi sui motoneuroni del nucleo ipoglosso risultano sensibilmente ridotti, mentre in seguito al trattamento con litio viene ripristinata l'immunopositività riscontrata nei topi wild-type.

Ulteriori studi sono in corso per valutare se questo effetto protettivo del litio osservato nel nucleo ipoglosso possa essere esteso agli altri nuclei interessati dalla malattia.

Ancora non conosciamo il significato funzionale di tale preservazione. Un'ipotesi suggestiva è che nei nuclei motori dei nervi encefalici la preservazione dei bottoni

sinaptici sui motoneuroni prodotta dal trattamento con litio possa avere un significato analogo alla preservazione delle cellule di Renshaw nel midollo spinale. Qui, le cellule di Renshaw, che vengono attivate dagli assoni collaterali dei MN ed inibiscono i MN stessi, costituendo il cosiddetto “circuito collaterale ricorrente inibitorio”, vengono perse precocemente nella storia naturale della malattia (Morrison et al., 1998; Fornai et al., 2008a). E’ stato ipotizzato che l’inibizione dei motoneuroni da parte delle cellule di Renshaw possa annullare i potenti effetti eccitatori dovuti all’intensa stimolazione glutammatergica. La precoce perdita di cellule di Renshaw e quindi del circuito ricorrente inibitorio nella SLA, potrebbe rendere i MN più vulnerabili alla tossicità del glutammato (Chang and Martin, 2009).

Se tale ipotesi venisse confermata, allora il mantenimento delle corrette e fisiologiche afferenze sui motoneuroni dei nuclei dei nervi encefalici, che non sembrano possedere cellule di Renshaw, potrebbe essere un meccanismo funzionale atto a contrastare la potenziale tossicità dovuta alle molteplici sinapsi eccitatorie su questi nuclei e su cui il litio sarebbe in grado di intervenire positivamente.

Il meccanismo alla base di questa diversa responsività al trattamento con litio dei motoneuroni del tronco dell’encefalo rispetto a quelli del midollo spinale resta sconosciuto. Una possibile spiegazione potrebbe essere ritrovata nel diverso potenziale neuronogenetico dei neuroni encefalici rispetto a quelli del midollo spinale.

A tale proposito, è noto che il litio è in grado di promuovere la differenziazione dei progenitori delle cellule neuronali (NPC) in neuroni contenenti calbindina D 28-k nell’ippocampo di ratto (Kim et al., 2004).

Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che nel midollo spinale del topo G93A il litio non solo protegge ma produce, in maniera malattia-dipendente, un aumento del numero di neuroni nella lamina VII, che sono addirittura superiori a quelli contati negli animali wild-type (Fornai et al., 2008a). Precedenti evidenze dimostrano che nella degenerazione da SLA (Juan et al., 2007), come in seguito ad un trauma del midollo spinale (Yang et al., 2006), aumenta il numero delle NPC nel midollo spinale. Tuttavia, in queste malattie croniche del midollo spinale le cellule neo-generate, visualizzate per mezzo dell'incorporazione di bromodeossiridina (BrdU), si differenziano successivamente in cellule gliali (Juan et al., 2007). Al contrario, nei topi G93A il trattamento con litio produce un aumento dell'incorporazione di BrdU in cellule della lamina VII che risultano anche positive per la calbindina D 28k e la gefirina, sopprimendo così la naturale differenziazione SLA-dipendente delle NPC in cellule gliali (Fornai et al., 2008a). Come per il midollo spinale, anche nel tronco dell'encefalo abbiamo osservato interessanti effetti del trattamento con litio sulla comparsa di nuove cellule all'interno dei nuclei motori lesi e sul loro presumibile differenziamento in senso neuronale. Queste nuove cellule, evidenziate per mezzo dell'incorporazione di BrdU, aumentano in maniera significativa nei topi G93A sia trattati con salina che con litio, ma solo in questi ultimi animali l'incremento della BrdU-immunopositività risulta associato all'aumento dell'immunomarcatura per il marcatore neuronale NeuN, come dimostrato dalla co-localizzazione dei due marker all'interno degli stessi neuroni. Corrispondentemente, il trattamento con litio riduce la gliosi reattiva, presente in tutti i nuclei lesi.

Questo dato è di straordinario interesse e potrebbe indicare una peculiare sensibilità dei neuroni encefalici agli effetti protettivi del litio, che potrebbe rendere particolarmente efficace la terapia con sali di litio proprio nel trattamento

delle forme più aggressive (bulbari) della malattia. Ulteriori studi sono in corso per valutare il fenotipo neuronale coinvolto in tale effetto neuronogenetico e per indagare il/i meccanismo/i alla base di questo effetto del litio.

BIBLIOGRAFIA

Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH. The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1994; 36: 846–58.

Angenstein F, Niessen HG, Goldschmidt J, Vielhaber S, Ludolph AC, Scheich H. Age-dependent changes in MRI of motor brain stem nuclei in a mouse model of ALS. *Neuroreport* 2004; 15: 2271–4.

Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 1997; 12: 25-31.

Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 2004; 429: 413-7.

Baltadzhieva R, Gurevich T, Korczyn AD. Autonomic impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 487-93.

Basak M, Erturk M, Oflazoglu B, Ozel A, Yildiz GB, Forta H. Magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2002; 105: 395-9.

Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 1989; 59: 411-9.

Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341: 197-205.

Blommaart EF, Luiken JJ, Blommaart PJ, van Woerkom GM, Meijer AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 2320-26.

Brockington A, Wharton SB, Fernando M, Gelsthorpe CH, Baxter L, Ince PG, Lewis CE, Shaw PJ. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the central nervous system in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 26-36.

Brujin LI, Beal MF, Becher MW, Schulz JB, Wong PC, Price DL, Cleveland DW. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *PNAS USA* 1997a; 94: 7606-11.

Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Cleveland DW. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 1997b; 18: 327-38.

Busceti CL, Biagioni F, Aronica E, Riozzi B, Storto M, Battaglia G, Giorgi FS, Gradini R, Fornai F, Caricasole A, Nicoletti F, Bruno V. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48: 694-705.

Cappuccio I, Calderone A, Busceti CL, Biagioni F, Pontarelli F, Bruno V, Storto M, Terstappen GT, Gaviraghi G, Fornai F, Battaglia G, Melchiorri D, Zukin RS, Nicoletti F, Caricasole A. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *J Neurosci* 2005; 25: 2647-57. Erratum in: *J Neurosci* 2005; 25: table of contents.

Carmichael J, Sugars KL, Bao YP, Rubinsztein DC. Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem* 2002; 277: 33791-8.

Castino R, Isidoro C, Murphy D. Autophagy-dependent cell survival and cell death in an autosomal dominant familial neurohypophyseal diabetes insipidus in vitro model. *FASEB J* 2005; 19: 1024-6.

Castino R, Lazzeri G, Lenzi P, Bellio N, Follo C, Ferrucci M, Fornai F, Isidoro C. Suppression of autophagy precipitates neuronal cell death following low doses of methamphetamine. *J Neurochem* 2008; 106: 1426-39.

Chang Q, Martin LJ. Glycinergic Innervation of Motoneurons Is Deficient in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice: A Quantitative Confocal Analysis. *Am J Pathol* 2009; 174: 574-85.

Chard PS, Bleakman D, Christakos S, Fullmer CS, Miller RJ. Calcium buffering properties of calbindin D-28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *J Physiol* 1993; 472: 341–57.

Chiu AY, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM, Gurney ME. Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 1995; 6: 349–62.

Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorov V, Kanai H, Hough C, Hiroi T, Leeds P. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord* 2002; 4: 129-36.

Chung YH, Joo KM, Lee YJ, Cha CI. Immunohistochemical study on the distribution of MnSOD in the central nervous system of the transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation. *Brain Res* 2003; 990: 215-20.

Chung YH, Joo KM, Nam RH, Cho MH, Kim DJ, Lee WB, Cha CI. Decreased expression of calretinin in the cerebral cortex and hippocampus of SOD1G93A transgenic mice. *Brain Res* 2005; 103: 105-9.

Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 806-19. Comment in: *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2002; 3: 55-6.

Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12 Suppl 2: 1509-18.

Cohen B, Caroscio J. Eye movements in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neural Transm Suppl* 1983; 19: 305-15.

Criollo A, Vicencio JM, Tasdemir E, Maiuri MC, Lavandero S, Kroemer G. The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy. *Autophagy* 2007; 3: 350-3.

Dal Canto MC, Gurney ME. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 1994; 145: 1271-9.

Dal Canto MC, Gurney ME. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res* 1995; 676: 25-40.

DePaul R, Abbs JH. Manifestations of ALS in the cranial motor nerves: dynamic, neuropathologic, and speech motor data. *Neurol Clin* 1987; 5: 231-50.

DePaul R, Abbs JH, Caligiuri M, Gracco VL, Brooks BR. Hypoglossal, trigeminal, and facial motoneuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1988; 38: 281-3.

Desport JC, Preux PM, Truong CT, Courat L, Vallat JM, Couratier P. Nutritional assessment and survival in ALS patients. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000; 1: 91-6.

Druschky A, Spitzer A, Platsch G, Claus D, Feistel H, Druschky K, Hilz MJ, Neundörfer B. Cardiac sympathetic denervation in early stages of amyotrophic lateral sclerosis demonstrated by 123I-MIBG-SPECT. *Acta Neurol Scand* 1999; 9: 308–14.

Duchen LW, Strich SJ. An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant “wobbler”. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1968; 31: 535-42.

Elliott JL, Snider WD. Parvalbumin is a marker of ALS-resistant motor neurons. *NeuroReport* 1995; 6: 449–52.

Ellis CM, Simmons A; Dawson JM, Williams SC, Leigh PN. Distinct hyperintense MRI signal changes in the corticospinal tracts of a patient with motor neuron disease. *Amyotroph Latearl Scler Other Motor Neuron Disord* 1999; 1: 41-4.

Ellis CM, Suckling J, Amaro E Jr, Bullmore ET, Simmons A, Williams SC, Leigh PN. Volumetric analysis reveals corticospinal tract degeneration and extramotor involvement in ALS. *Neurology* 2001; 57: 1571-8.

Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 2005; 1: 1-10.

Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 495-502.

Feng HL, Leng Y, Ma CH, Zhang J, Ren M, Chuang DM. Combined lithium and valproate treatment delays disease onset, reduces neurological deficits and prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neuroscience* 2008; 155: 567-72.

Fernagut PO, Diguët E, Labattu B, Tison F. A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. *J Neurosci Methods* 2002; 113: 123-30.

Fisher LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 2004; 18: 232-40.

Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsiuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P, Modugno N, Siciliano G, Isidoro C, Murri L, Ruggieri S, Paparelli A. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008a; 105: 2052-7.

Fornai F, Longone P, Ferrucci M, Lenzi P, Isidoro C, Ruggieri S, Paparelli A. Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy* 2008b; 4: 527-30.

Gizzi M, Di Rocco A, Sivak M, Cohen B. Ocular motor function in motor neuron disease. *Neurology* 1992; 42: 1037-46.

Guo S, Arai K, Stins MF, Chuang DM, Lo EH. Lithium upregulates vascular endothelial growth factor in brain endothelial cells and astrocytes. *Stroke* 2009; 40: 652-5.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 264: 1772-5. Erratum in: *Science* 1995; 269: 149.

Gurney ME. The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J Neurol Sci* 1997a; 152 Suppl 1:S67-73.

Gurney ME. Transgenic animal models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 1997b; 244 Suppl 2:S15-20.

Haenggeli C, Kato AC. Differential vulnerability of cranial motoneurons in mouse models with motor neuron degeneration. *Neurosci Lett* 2002; 335: 39-43.

Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annur A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S et al. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 2003; 300: 808-12.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; 441: 885-9.

Hartmann HA, McMahon S, Sun DY, Abbs JH, Uemura E. Neuronal RNA in nucleus ambiguus and nucleus hypoglossus of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1989; 48: 669-73.

Harvey DG, Torack RM, Rosenbaum HE. Amyotrophic lateral sclerosis with ophthalmoplegia. *Arch Neurol* 1979; 36: 615-7.

Hillel AD, Miller RM. Management of bulbar symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Exp Med Biol* 1987; 209: 201-21.

Hillel AD, Miller R. Bulbar amyotrophic lateral sclerosis: patterns of progression and clinical management. *Head Neck* 1989; 11: 51-9.

Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984; 43: 471-80.

Hirano A. Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* 1991; 56: 91-101.

Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10242-7.

Jonsson PA, Graffmo KS, Brännström T, Nilsson P, Andersen PM, Marklund SL. Motor neuron disease in mice expressing the wild type-like D90A mutant superoxide dismutase-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65: 1126-36.

Joje RS. Anti-bipolar therapy: mechanism of actions of lithium. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 117-128.

Juan L, Dawei Z, Julie AD. Increased number and differentiation of neural precursor cells in the brainstem of superoxide dismutase 1(G93A) (G1H) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res* 2007; 29: 204-9.

Kabaya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19: 5720-8.

Kabuta T, Suzuki Y, Wada K. Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 2006; 281: 30524-33.

Kaplan LM, Hollander D. Respiratory dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Chest Med* 1994; 15: 675–81.

Kawai S, Tsukuda M, Mochimatsu I, Enomoto H, Kagesato Y, Hirose H et al. A study of the early stage of dysphagia in amyotrophic lateral sclerosis. *Dysphagia* 2003; 18: 1-8.

Kim JS, Chang MY, Yu IT, Kim JH, Lee SH, Lee YS, Son H. Lithium selectively increases neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells both in vitro and in vivo. *J Neurochem* 2004; 89: 324-36.

Kitazawa M, Trinh DN, LaFerla FM. Inflammation induces tau pathology in inclusion body myositis model via glycogen synthase kinase-3beta. *Ann Neurol* 2008; 64: 15-24.

Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 931–7.

Kadoyama K, Funakoshi H, Ohya W, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res* 2007; 59: 446-56.

Komiyama M, Shibata H, Suzuki T. Somatotopic representation of facial muscles within the facial nucleus of the mouse. A study using the retrograde horseradish peroxidase and cell degeneration techniques. *Brain Behav Evol* 1984; 24: 144-51.

Kong J, Xu Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 1998; 18: 3241–50.

Kusaka H, Imai T, Hashimoto S, Yamamoto T, Maya K, Yamasaki M. Ultrastructural study of chromatolytic neurons in an adult-onset sporadic case of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 1988; 75: 523-8.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003; 34: 383-94.

LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascaño J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS, Holzbaur EL. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 2002; 34: 715-27.

Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4343-54.

Leigh PN, Swash M. Cytoskeletal pathology in motor neuron diseases. *Adv Neurol* 1991; 56: 115-24.

Leveille A, Kiernan J, Goodwin JA, Antel J. Eye movements in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 1982; 39: 684–6.

Lever TE, Gorsek A, Cox KT, O'Brien KF, Capra NF, Hough MS, Murashov AK. An Animal Model of Oral Dysphagia in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Dysphagia* 2009; 24: 180-95.

Lladó J, Haenggeli C, Pardo A, Wong V, Benson L, Coccia C, Rothstein JD, Shefner JM, Maragakis NJ. Degeneration of respiratory motor neurons in the SOD1 G93A transgenic rat model of ALS. *Neurobiol Dis* 2006; 21: 110-8.

Lledo PM, Somasundaram B, Morton AJ, Emson PC, Mason WT. Stable transfection of calbindin-D28k into the GH3 cell line alters calcium currents and intracellular calcium homeostasis. *Neuron* 1992; 9: 943–54.

Low P. Laboratory evaluation of autonomic function. In: Low P, editor. *Clinical autonomic disorders*. Lippincott–Raven Publishers. 1997.

Manji HK, Lenox RH. Lithium: a molecular transducer of mood-stabilization in the treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 1998; 19: 161-6.

Manji HK, More GJ, Chen G. Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been over-looked? *Biol Psychiatry* 1999; 46: 929-40.

Martin JH. *Neuroanatomy* (3th edition). McGraw-Hill. 2005.

Martin LJ. Transgenic mice with human mutant genes causing Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis provide common insight into mechanisms of motor neuron selective vulnerability to degeneration. *Rev Neurosci* 2007; 18: 115-36.

Martin LJ, Liu Z, Chen K, Price AC, Pan Y, Swaby JA, Golden WC. Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death. *J Comp Neurol* 2007; 500: 20-46.

Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos S. Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 1991; 6: 41-51.

Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Dong L et al. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2002; 125: 1522-33.

Menzies FM, Ravikumar B, Rubinsztein DC. Protective roles for induction of autophagy in multiple proteinopathies. *Autophagy* 2006; 2: 224-5.

Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT: Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 1999a; 18: 7860-72.

Miller RG, Rosenberg JA, Gelinas NF, Mitsumoto H, Newman D, Sufit R, Borasio GD, Bradley WG, Bromberg MB, Brooks BR, Kasarskis EJ, Munsat TL, Oppenheimer EA. Practice parameter: the care of the patient with amyotrophic lateral sclerosis (An evidence-based review) - Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 1999b; 52: 1311-23.

Miller JR. The Wnts. *Genome Biology* 2002; 3: REVIEWS3001.1-3000. 15.

Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn MC. Selective loss of α -motoneurons innervating the medial gastrocnemius muscle in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 1998; 150: 329-36.

Morrison BM, Janssen WG, Gordon JW, Morrison JH. Time course of neuropathology in the spinal cord of G86R superoxide dismutase transgenic mice. *J Comp Neurol* 1998; 391: 64-77.

Mudher A, Shepherd D, Newman TA, Mildren P, Jukes JP, Squire A et al. GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 522-30.

Niessen HG, Angenstein F, Sander K, Kunz WS, Teuchert M, Ludolph AC, Heinze HJ, Scheich H, Vielhaber S. In vivo quantification of spinal and bulbar motor neuron degeneration in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of ALS by T2 relaxation time and apparent diffusion coefficient. *Exp Neurol* 2006; 201: 293-300.

Niessen HG, Debska-Vielhaber G, Sander K, Angenstein F, Ludolph AC, Hilfert L, Willker W, Leibfritz D, Heinze HJ, Kunz WS, Vielhaber S. Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 1669-77.

Nimchinsky EA, Young WG, Yeung G, Shah RA, Gordon JW, Bloom FE, Morrison JH, Hof PR. Differential vulnerability of oculomotor, facial, and hypoglossal nuclei in G86R superoxide dismutase transgenic mice. *J Comp Neurol* 2000; 416: 112-25.

Nishihira Y, Tan CF, Hoshi Y, Iwanaga K, Yamada M, Kawachi I, Tsujihata M, Hozumi I, Morita T, Onodera O, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration is associated with relatively mild TDP-43 pathology. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 45-53.

Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 1998; 273: 3963-66.

Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, Fan SY, Kim H, Stewart WB, Madri JA, Ment LR. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J Biol Chem* 2002; 277: 11410-5.

Okamoto K, Hirai S, Amari M, Iizuka T, Watanabe M, Murakami N, Takatama M. Oculomotor nuclear pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 1993; 85: 458-62.

Okamoto K, Mizuno Y, Fujita Y. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology* 2008; 28; 109-15.

Paoletti R, Nicosia S, Clementi F, Fumagalli G. *Farmacologia generale e molecolare*. UTET. 1996.

Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 710-23.

Paxinos G and Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. 2004.

Poesen K, Lambrechts D, Van Damme P, Dhondt J, Bender F, Frank N, Bogaert E, Claes B, Heylen L, Verheyen A, Raes K, Tjwa M, Eriksson U, Shibuya M, Nuydens R, Van Den Bosch L et al. Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration. *J Neurosci* 2008; 28: 10451-9.

Preston DC, Shapiro BE, Raynor EM, Kothari MJ. The relative value of facial, glossal, and masticatory muscles in the electrodiagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1997; 20: 370-2.

Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 2002; 11:1107-17.

Ravikumar B, Rubinsztein DC. Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins? *Neuroreport* 2004; 15: 2443-5.

Reiner A, Medina L, Figueredo-Cardenas G, Anfinsen S. Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanisms in sporadic ALS. *Exp Neurol* 1995; 131: 239–50.

Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 689-93.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59-62.

Rosenstein JM, Mani N, Khaibullina A, Krum JM. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 11036-44.

Rowland LP. Amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol* 1994; 7: 310-5.

Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 2001; 344: 1688-1700.

Rubinsztein DC, Ravikumar B, Acevedo-Arozena A, Imarisio S, O'Kane CJ, Brown SD. Dyneins, autophagy, aggregation and neurodegeneration. *Autophagy* 2005; 1: 177-8.

Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 720-5.

Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* 2005; 170: 1101-11.

Sarkar S, Rubinsztein DC. Inositol and IP3 levels regulate autophagy: biology and therapeutic speculations. *Autophagy* 2006; 2: 132-4.

Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O’Kane CJ, Rubinstzein DC. A rational mechanism for combination treatment of Huntington’s disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 170-8.

Sasaki S, Warita H, Komori T, Murakami T, Abe K, Iwata M. Parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivity in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Research* 2006; 1083: 196-203.

Schmalbruch H, Jensen HJ, Bjaerg M, Kamieniecka Z, Kurland L. A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991; 50: 192-204.

Scozzafava A, Viezzoli MS. The role of the active site amino acid residues on the catalytic activity of CuZn SOD. *Mol Chem Neuropathol* 1993; 19: 193-204.

Shefner JM, Logigian EL. The mixed nerve silent period in normal subjects and patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 1998; 38: 505-10.

Shibata N, Hirano A, Kobayashi M, Sasaki S, Kato T, Matsumoto S, Shiozawa Z, Komori T, Ikemoto A, Umahara T et al. Cu/Zn superoxide dismutase-like immunoreactivity in Lewy body-like inclusions of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 1994; 179: 149-52.

Shin JH, Cho SI, Lim HR, Lee JK, Lee YA, Noh JS, Joo IS, Kim KW, Gwag BJ. Concurrent administration of Neu2000 and lithium produces marked improvement of motor neuron survival, motor function, and mortality in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 965-75.

Siddique T. Molecular genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* 1991; 56: 227-31.

Siklós L, Engelhardt JI, Alexianu ME, Gurney ME, Siddique T, Appel SH. Intracellular calcium parallels motoneuron degeneration in SOD-1 mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 571–87.

Skurk C, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K. Glycogen-Synthase Kinase3beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res* 2005; 96: 308-18.

Smittkamp SE, Brown JW, Stanford JA. Time-course and characterization of orolingual motor deficits in B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J mice. *Neuroscience* 2008; 151: 613-21.

Sondell M, Sundler F, Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 4243-54.

Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 1996; 6: 1664-8.

Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, Wyns S, Manka D, Vermeulen K, Van Den Bosch L, Mertens N, Schmitz C et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* 2005; 8: 85-92.

Su H, Chu TK, Wu W. Lithium enhances proliferation and neuronal differentiation of neuronal progenitor cells in vitro and after transplantation into the adult rat spinal cord. *Exp Neurol* 2007; 206: 296-307.

Tainer JA, Getzoff ED, Beem KM, Richardson JS, Richardson DC. Determination and analysis of the 2-A structure of copper zinc superoxide dismutase. *J Mol Biol* 1982; 160: 181-217.

Tandan R, Bradley WG. Amyotrophic lateral sclerosis: Part 1. Clinical features, pathology, and ethical issues in management. *Ann Neurol* 1985; 18: 271-80.

Tankersley CG, Haenggeli C, Rothstein JD. Respiratory impairment in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Appl Physiol* 2007; 102: 926-32.

Tayama N. Dysphagia in amyotrophic lateral sclerosis—the mechanism and managements. *Rinsho Shinkeigaku* 1995; 35: 1557-9.

Teuling E, van Dis V, Wulf PS, Haasdijk ED, Akhmanova A, Hoogenraad CC, Jaarsma D. A novel mouse model with impaired dynein/dynactin function develops amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like features in motor neurons and improves lifespan in SOD1-ALS mice. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 2849-62.

von Lewinski F, Fuchs J, Vanselow BK, Keller BU. Low Ca²⁺ buffering in hypoglossal motoneurons of mutant SOD1 (G93A) mice. *Neurosci Lett* 2008; 445: 224-8.

Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 933-41.

Weiss A, Klein C, Woodman B, Sathasivam K, Bibel M, Régulier E, Bates GP, Paganetti P. Sensitive biochemical aggregate detection reveals aggregation onset before symptom development in cellular and murine models of Huntington's disease. *J Neurochem* 2008; 104: 846-58.

Weydt P, Hong SY, Kliot M, Möller T. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport* 2003; 14: 1051-4.

Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 1995; 14: 1105-16.

Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2001; 29: 160-5. Comment in: *Nat Genet* 2001; 29: 103-4.

Yang H, Lu P, McKay HM, Bernot T, Keirstead H, Steward O, Gage FH, Edgerton VR, Tuszynski MH. Endogenous neurogenesis replaces oligodendrocytes and astrocytes after primate spinal cord injury. *J Neurosci* 2006; 26: 2157-66.

Zang DW, Yang Q, Wang HX, Egan G, Lopes EC, Cheema SS. Magnetic resonance imaging reveals neuronal degeneration in the brainstem of the superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 1745-51.

Zhang F, Stroöm AN, Fukada K, Lee S, Hayward LJ, Zhu H. Interaction between Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)-linked SOD1 Mutants and the Dynein Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 16691–9.

Zheng C, Nennesmo I, Fadeel B, Henter JI. Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol* 2004; 56: 564-7.