

## ORIGINAL

### Cambios celulares producidos por la citotoxicidad del líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica sobre cultivos de neuronas motoras

U. Gomez-Pinedo<sup>a,\*</sup>, M. Yáñez<sup>b</sup>, J. Matías-Guiu<sup>a</sup>, L. Galán<sup>a</sup>, A. Guerrero-Sola<sup>a</sup>,  
M.S. Benito-Martin<sup>a</sup>, Á. Vela<sup>a</sup>, J.A. Arranz-Tagarro<sup>b</sup> y A.G. García<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Neurociencias, IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense, Madrid, España

<sup>b</sup> Instituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Recibido el 5 de agosto de 2013; aceptado el 20 de agosto de 2013

Accesible en línea el 19 de octubre de 2013

#### PALABRAS CLAVE

Esclerosis lateral  
amiotrófica;  
Líquido  
cefalorraquídeo;  
Neurotoxicidad;  
Periferina;  
Caspasa-3;  
TNF $\alpha$ ;  
Glutamato

#### Resumen

**Introducción:** Los efectos neurotóxicos del líquido cefalorraquídeo (LCR) procedentes de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) han sido descritos por varios autores que han atribuido esta neurotoxicidad al efecto de glutamato del LCR-ELA.

**Material y métodos:** Se han expuesto cultivos de neuronas embrionarias corticales de rata con un incubación de 24 h y el LCR procedente de pacientes con ELA, valorando las alteraciones celulares a través de microscopía óptica en comparación con aquellas que produce con 100 mM de glutamato y la inmunohistoquímica de caspasa-3, TNF y periferina a través de microscopía confocal.

**Resultados:** En el cultivo expuesto a LCR-ELA se observan células con fragmentación del núcleo con escasa o nula modificación estructural de los organelos citoplasmáticos y mantenimiento de la membrana plasmática, lo que no ocurre con la exposición a glutamato. Se observa un aumento de caspasa-3 y de TNF $\alpha$  y un incremento de periferina que co-localiza con caspasa-3 pero no con TNF $\alpha$ , lo hace sugerir que puede tener un papel precoz en el desarrollo de la apoptosis.

**Conclusiones:** La citotoxicidad por LCR-ELA no se relaciona con el glutamato, que provoca una afectación nuclear precoz sin alteración de la membrana citoplasmática produciendo una apoptosis citoplasmática que conlleva un incremento de caspasa-3 que co-localiza con sobre-expresión anómala de periferina.

© 2013 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: [inc.hcsc@salud.madrid.org](mailto:inc.hcsc@salud.madrid.org), [u.gomez.pinedo@gmail.com](mailto:u.gomez.pinedo@gmail.com), [ulisesalfonso.gomez@salud.madrid.org](mailto:ulisesalfonso.gomez@salud.madrid.org)  
(U. Gomez-Pinedo).

**KEYWORDS**

Amyotrophic lateral sclerosis;  
Cerebrospinal fluid;  
Neurotoxicity;  
Peripherin;  
Caspase-3;  
TNF $\alpha$ ;  
Glutamate

**Cellular changes in motor neuron cell culture produced by cytotoxic cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis****Abstract**

**Introduction:** The neurotoxic effects of cerebrospinal fluid (CSF) from patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have been reported by various authors who have attributed this neurotoxicity to the glutamate in CSF-ALS.

**Material and methods:** Cultures of rat embryonic cortical neurons were exposed to CSF from ALS patients during an incubation period of 24 hours. Optical microscopy was used to compare cellular changes to those elicited by exposure to 100  $\mu$ M glutamate, and confocal microscopy was used to evaluate immunohistochemistry for caspase-3, TNF $\alpha$ , and peripherin.

**Results:** In the culture exposed to CSF-ALS, we observed cells with nuclear fragmentation and scarce or null structural modifications to the cytoplasmic organelles or to plasma membrane maintenance. This did not occur in the culture exposed to glutamate. The culture exposed to CSF-ALS also demonstrated increases in caspase-3, TNF $\alpha$ , and in peripherin co-locating with caspase-3, but not with TNF $\alpha$ , suggesting that TNF $\alpha$  may play an early role in the process of apoptosis.

**Conclusions:** CSF-ALS cytotoxicity is not related to glutamate. It initially affects the nucleus without altering the cytoplasmic membrane. It causes cytoplasmic apoptosis that involves an increase in caspase-3 co-located with peripherin, which is also overexpressed.

© 2013 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

El líquido cefalorraquídeo procedente de algunos pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (LCR-ELA) tiene una característica específica que es la posibilidad de provocar una reducción de la supervivencia celular en cultivos de neuronas motoras, en lo que se ha denominado como efecto citotóxico<sup>1</sup>. Este efecto se limita al LCR<sup>2-8</sup> y ha sido repetidamente demostrado<sup>9-13</sup>. En un estudio previo<sup>14</sup>, hemos observado efectivamente este mecanismo en cultivos de neuronas, y hemos comprobado que es independiente del glutamato a través de exponerlo a distintos antagonistas. El motivo del actual estudio es comprobar qué cambios celulares se producen en los cultivos neuronales expuestos al LCR-ELA.

**Material y métodos**

El LCR obtenido por punción lumbar de 3 pacientes con el diagnóstico de ELA, definida según los criterios del Escorial-Arlie Diagnostic Criteria<sup>15</sup> obteniéndose entre 1,5-3 cc, centrifugado, alícuotado y almacenado a  $-80^{\circ}$  hasta el momento de exposición al cultivo. De la misma forma, se extrajo el LCR de 3 pacientes controles, cuya punción lumbar se hizo formado parte del diagnóstico de cefalea o crisis epiléptica. Todos los pacientes y controles firmaron el consentimiento informado.

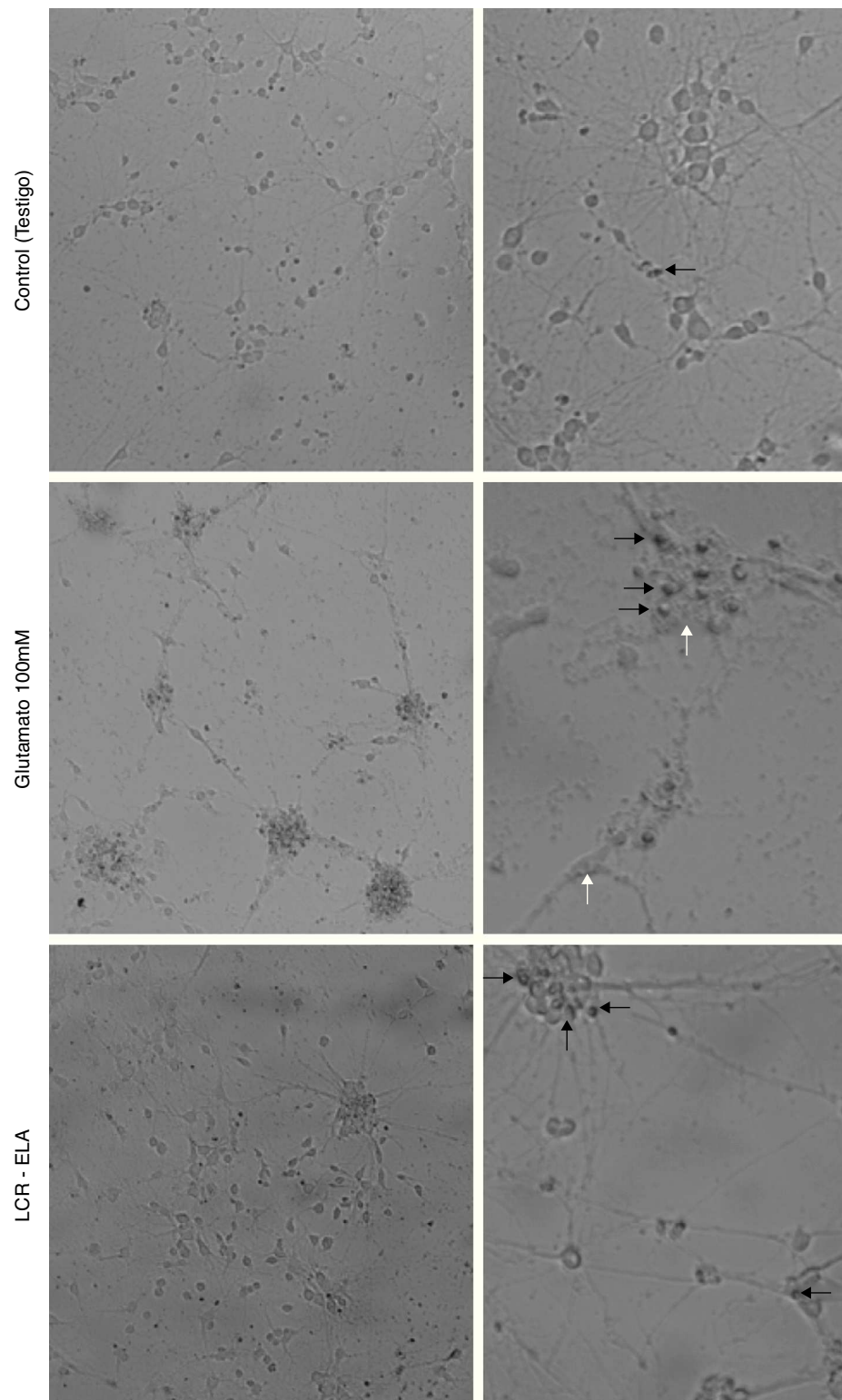
La extracción y el mantenimiento de los cultivos de neuronas embrionarias motoras de rata se realizaron bajo el protocolo descrito anteriormente por Yañez et al., 2011<sup>14</sup>. Los cultivos fueron expuestos inicialmente al LCR-ELA, LCR-control y a 100 mM de glutamato, así como el cultivo basal incubados durante 24 h y analizados mediante microscopía óptica e inmunohistoquímica.

Para la determinación de los estudios inmunohistoquímicos previa fijación de las células, se utilizaron

anticuerpos anti-caspase-3 (1:200, Millipore, 04-1090), anti-TNF $\alpha$  (1:100, Abcam ab66579), anti-peripherin (1:500, Millipore, AB9282), FluoroPan Neuronal Marker para marcar todas las células de origen neural (1:100, Millipore MAB2300 $\times$ ) seguido de las incubaciones con los anticuerpos secundarios pertinentes (Alexa 488, 555 o 647, 1:500, Invitrogen), posteriormente se contrastaron los núcleos con DRAQ5 (1:3000, Abcam, ab108410). Las imágenes de contraste de fases y de inmunofluorescencia fueron adquiridas en un microscopio invertido Olympus acoplado a un sistema de microscopio confocal Olympus FV1000<sup>®</sup>. El análisis cuantitativo se efectuó a través de *analysis software* ImageJ (versión 1.42) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), realizando todas las cuantificaciones bajo doble ciego. Para el análisis estadístico utilizamos el *software* GraphPad Prism 5, y los valores se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM).

**Resultados**

Los cambios celulares observados por microscopía óptica que se producen en el cultivo de neuronas motoras tras la exposición con glutamato (100 mM) presentan signos de degeneración autofágica, caracterizadas por vacuolización autofágica del citoplasma, degeneración granulovacuolar, además de células picnóticas y una clara condensación de la cromatina. Contrariamente, en el cultivo expuesto al LCR-ELA se observan células con retracción de las proyecciones celulares, reducción del volumen celular, fragmentación del núcleo (cariorexis), condensación de la cromatina (picnosis), con escasa o nula modificación estructural de los organelos citoplasmáticos, burbujas de membrana plasmática y mantenimiento de la membrana plasmática (fig. 1). La comparación de ambas imágenes muestran como los cambios celulares producidos por el LCR-ELA y glutamato son distintos.



**Figura 1** Cambios celulares en el cultivo de neuronas motoras tras la exposición a control, glutamato 100mM y LCR-ELA. En el control, la flecha negra indica células picnóticas. En el cultivo expuesto a glutamato, las flechas blancas señalan vacuolas autofágicas, y en las flechas negras condensación de cromatina. En el cultivo expuesto a LCR-ELA, las flechas negras indican mantenimiento de la membrana citoplasmática.

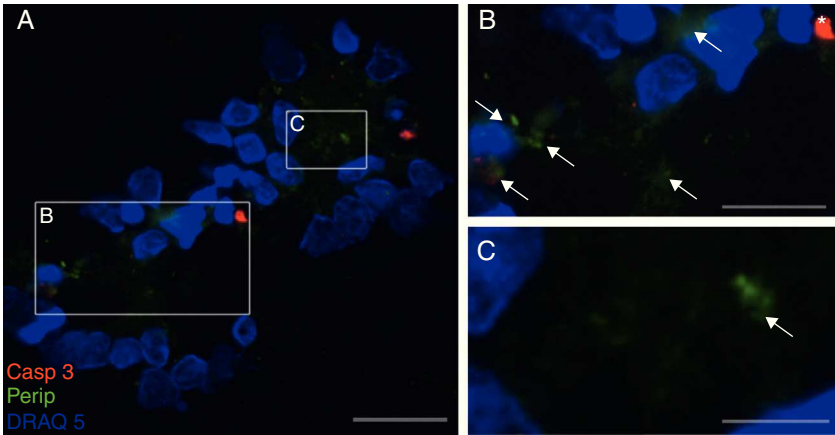
**Tabla 1** Inmunohistoquímica de caspasa-3 y TNF $\alpha$  en los 3 tipos de cultivos

| Grupo             | Neuronas <sup>a</sup> | Caspasa-3      | TNF $\alpha$  |
|-------------------|-----------------------|----------------|---------------|
| Control (testigo) | 99,0 $\pm$ 0,2        | 7,10 $\pm$ 3,4 | 2,2 $\pm$ 0,7 |
| LCR-CTL           | 98,7 $\pm$ 0,6        | 10,3 $\pm$ 6,6 | 2,4 $\pm$ 0,1 |
| LCR-ELA           | 98,6 $\pm$ 0,8        | 27,8 $\pm$ 7,9 | 4,9 $\pm$ 1,3 |

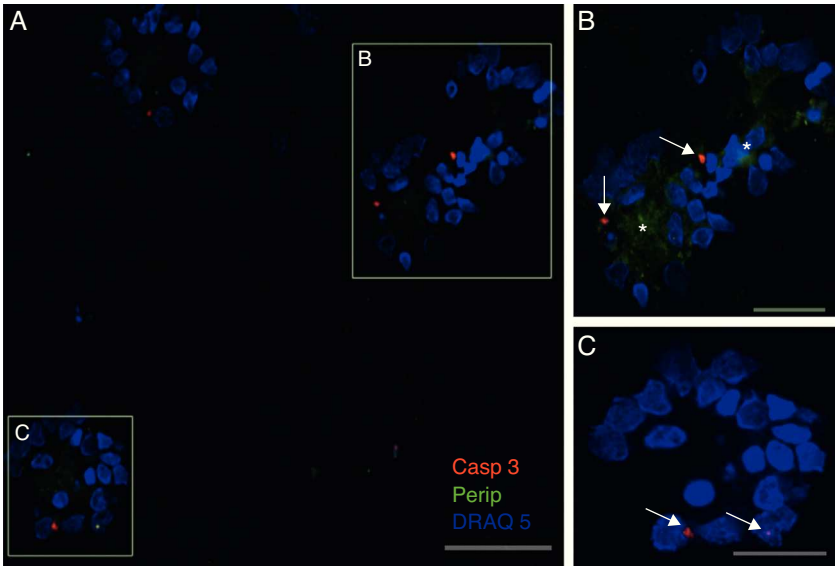
Media  $\pm$  DE. Datos expresados en porcentaje.  
<sup>a</sup> Porcentaje de células positivas a marcaje inmunohistoquímico a neuronas (FluoroPan Neuronal Marker Ref: MAB2300 $\times$ ).

Al comparar el número de células marcadas mediante la inmunohistoquímica en los cultivos controles, basales, y aquellos expuestos al LCR controles con los expuestos al LCR-ELA, se observa un incremento significativo de caspasa-3 y de TNF $\alpha$  en estos últimos (tabla 1), no habiendo

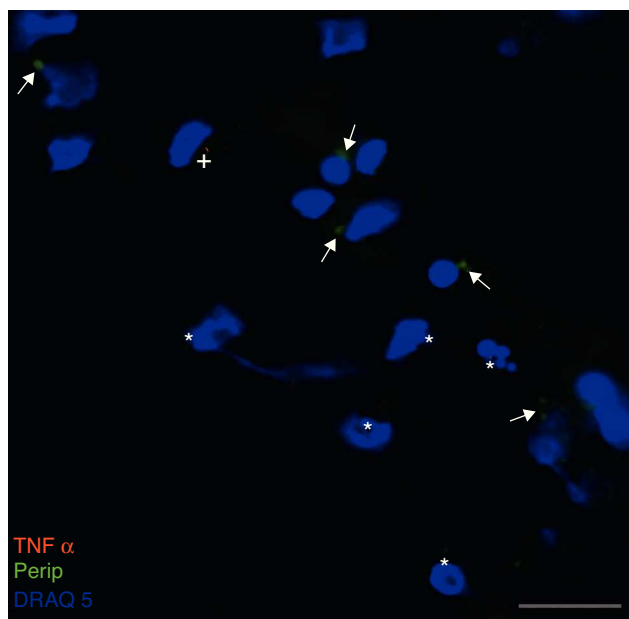
diferencias entre los 2 primeros. El marcaje de caspasa-3 mostró una media  $\pm$  DE de 27,8 $\pm$ 7,9 al exponer al LCR-ELA frente a 7,1 $\pm$ 3,4 y 10,3 $\pm$ 6,6 en los otros 2 grupos. Con relación a TNF $\alpha$  la media  $\pm$  DE tras la exposición al LCR-ELA fue de 4,9 $\pm$ 1,3 frente a 2,2 $\pm$ 0,7 y 2,4 $\pm$ 0,1, respectivamente. La comparación de los datos muestra, por lo tanto, que la exposición al LCR-ELA supone a las 24 h de incubación un aumento de caspasa-3 y de TNF $\alpha$ . Exclusivamente en el cultivo expuesto al LCR-ELA se muestra la expresión de periferina, no apareciendo en los demás cultivos. La expresión de esta proteína se observó en el grupo de células expuestas al LCR-ELA, en forma de pequeños precipitados citoplasmáticos (fig. 2). Se observan células que expresan caspasa-3 que no co-expresan periferina, pero hay células con marcaje caspasa-3 positivas que la co-expresan (fig. 3). Existen células con expresión de periferina sin que se observe marcaje de TNF $\alpha$  en ellas, lo que



**Figura 2** Co-expresión de caspasa-3 y periferina en el cultivo de LCR-ELA (A-C). El marcaje de caspasa-3 (rojo), de periferina (verde-flechas) y de núcleos (azul) (A-C). La expresión de periferina se observó en forma de pequeños precipitados citoplasmáticos (flechas, B y C) y células caspasa-3 positivas (asterisco). Barra: A) 30 micras, B) 15 micras y C) 5 micras.



**Figura 3** Co-expresión de caspasa-3 y periferina en el cultivo de LCR-ELA. El marcaje de caspasa-3 (rojo-asterisco), de periferina (verde-flecha) y de núcleos (azul) (A-C). En la imagen B se observan inclusiones que expresan periferina (asteriscos), mientras que la expresión de caspasa-3 está marcada con flechas (B y C). Barra: A) 60 micras, B) 40 micras y C) 20 micras.



**Figura 4** Co-expresión de  $\text{TNF}\alpha$  y periferina en el cultivo de LCR-ELA. Las flechas indican inclusiones de periferina positivas en células que no expresan  $\text{TNF}\alpha$ , y células  $\text{TNF}\alpha$  positivas (+), el asterisco (\*) muestra las células con degradación nuclear. Barra: 30 micras.

hace postular que la expresión de periferina antecede al incremento de  $\text{TNF}\alpha$  (fig. 4). En consecuencia, la comparación entre los cultivos nos muestra como la exposición del LCR-ELA produce una sobreexpresión de periferina que es previa al aumento de  $\text{TNF}\alpha$  a las 24 h de exposición.

## Discusión

El diagnóstico de citotoxicidad por el LCR-ELA en los cultivos de neuronas motoras primarias se ha basado en distintas técnicas de laboratorio que han variado dependiendo del grupo de investigación. Así, por ejemplo, se ha utilizado la determinación de LDH intracelular<sup>16</sup>, expresión de CHAT<sup>17</sup>, viabilidad celular a través de MTT o técnica similar<sup>14,17</sup>, recuento de células vivas<sup>9,10,17</sup>, calcio intracelular<sup>14</sup> o expresión de neurofilamentos fosforilados<sup>18</sup>. Nuestro estudio confirma que la citotoxicidad ha demostrado por la viabilidad celular mediante MTT, que se asocia al incremento de caspasa-3 y, por lo tanto, se correlaciona con el desarrollo de apoptosis.

Nuestro estudio demuestra que los cambios celulares que se observan como consecuencia de la exposición a un cultivo de neuronas motoras por el LCR-ELA son distintos a aquellos que se producen al añadir 100 mM de glutamato, y que conducen a una apoptosis con incremento de  $\text{TNF}\alpha$ . La excitotoxicidad inducida por glutamato ha sido implicada como uno de los mecanismos de la ELA y de su modelo en roedor con SOD1 mutada<sup>19,20</sup>. Ello ha venido reforzado porque la neurotransmisión excitatoria de las motoneuronas medulares dependen especialmente de los receptores AMPA, lo que podría explicar la vulnerabilidad específica de estas células<sup>21</sup> y, porque riluzole, que es el único fármaco

que ha mostrado un discreto efecto protector prolongando la vida de los pacientes unos pocos meses<sup>22,23</sup> bloquea el efecto presináptico del glutamato, inhibe la entrada de calcio, sobrerregula los receptores de AMPA y bloquea el efecto de los receptores de NMDA y AMPA<sup>24-26</sup>.

Existe muy poca información en la literatura sobre los cambios celulares producidos por el efecto citotóxico del LCR de pacientes de la ELA, habiéndose descrito desde astrocitosis<sup>27-29</sup>, en modelos *in vivo* o cultivos que son mixtos con astrocitos, vacuolas<sup>30,31</sup>, signos pre o pro apoptóticos<sup>32-34</sup>, o signos de muerte celular<sup>35</sup>. Nuestros datos muestran que los cambios son distintos a lo que se observa tras la exposición de glutamato al cultivo, reforzando nuestra conclusión en un estudio previo que el mecanismo del LCR-ELA es independiente del glutamato a través de exponerlo a distintos antagonistas<sup>14</sup>.

Los cambios celulares observados sugieren que en la exposición al LCR-ELA es más precoz la afectación nuclear que la alteración de la membrana celular o de organelas citoplasmáticas. Este hecho ya ha sido observado en la enfermedad<sup>36</sup>, en el modelo transgénico de la ELA<sup>37</sup> y en forma de la ELA familiar autosómica dominante (ALS8)<sup>38,39</sup>, que produce una proteína mutada que lleva a la formación de membranas de RE en el citoplasma donde se observa alteraciones en el envoltorio nuclear, que conduce a un bloqueo del transporte de nucleoporinas al envoltorio nuclear, quedando estas proteínas secuestradas en el citoplasma<sup>40</sup>. Nuestros hallazgos sugerirían que el mecanismo citotóxico podría penetrar inicialmente en las motoneuronas sin lesionar la membrana celular y, probablemente, por acumulo anómalo de proteínas en el citoplasma, lo que explicaría que el mecanismo de apoptosis demostrado por el incremento de caspasa-3 se asocia a un aumento de  $\text{TNF}\alpha$ <sup>35</sup>, que probablemente aumentaría su expresión si la incubación del cultivo hubiera sido superior a 24 h.

La periferina es una proteína neuronal de filamentos intermedios que predomina en el sistema nervioso periférico, aunque se ha encontrado en algunas poblaciones neuronales del sistema nervioso central, y se ha descrito su sobreexpresión en algunas enfermedades neurodegenerativas. En la ELA, mutaciones sobre su gen se asocia a formas esporádicas y su sobreexpresión conduce a una enfermedad de motoneurona en el roedor<sup>41</sup>. Mizuno et al.,<sup>42</sup> han descrito su presencia en los cuerpos de Bunina, que son característicos de las formas no relacionadas con SOD1 de la enfermedad<sup>43</sup>. Un ratón desarrollado con una mutación de TDP-43 que presenta un cuadro clínico similar a la ELA con degeneración fronto-temporal presenta sobreexpresión de periferina<sup>44</sup>. La presencia de esta proteína en los cultivos expuestos al LCR-ELA refuerza la hipótesis de Mizuno et al.<sup>42</sup> que la periferina podía tener un papel en el desarrollo de la ELA, y considerando que reduce el efecto de BDNF<sup>45</sup> y que riluzole actúa sobre sus receptores, este mecanismo podría explicar cómo podría actuar este fármaco al margen del glutamato. El hecho que el incremento de periferina anteceda al aumento de  $\text{TNF}\alpha$  hace evidenciar que puede tener un papel precoz en el desarrollo de la apoptosis, reforzando la observación de que co-localiza con caspasa-3.

En resumen, nuestro trabajo refuerza la idea que la citotoxicidad por el LCR-ELA no se relaciona con el glutamato, que provoca una afectación nuclear precoz sin alteración de la membrana citoplasmática produciendo una apoptosis



citoplasmática que conlleva un incremento de caspasa-3 que co-localiza con sobreexpresión anómala de periferina.

## Financiación

La investigación en la que se basa este artículo está financiada por el proyecto «Vulnerabilidad selectiva de la motoneurona a los efectos neurotóxicos del líquido cefalorraquídeo de pacientes en esclerosis lateral amiotrófica (ELA)» concedido por la Fundación Mutua Madrileña 2008, 2009.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Matías-Guiu J, Galán L, García-Ramos R, Cuadrado L, Barcia JA. La citotoxicidad del líquido cefalorraquídeo en la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurologia*. 2010;25:364–73.
- Horwich MS, Engel WK, Chauvin PB. Amyotrophic lateral sclerosis sera applied to cultured motor neurons. *Arch Neurol*. 1974;30:332–3.
- Liveson J, Frey H, Bornstein MB. The effect of serum from ELA patients on organotypic nerve and muscle tissue cultures. *Acta Neuropathol*. 1975;32:127–31.
- Lehrich JR, Couture J. Amyotrophic lateral sclerosis sera are not cytotoxic to neuroblastoma cells in tissue culture. *Ann Neurol*. 1978;4:384.
- Touzeau G, Kato AC. Effects of amyotrophic lateral sclerosis sera on cultured cholinergic neurons. *Neurology*. 1983;33:317–22.
- Touzeau G, Kato AC. ELA serum has no effect on three enzymatic activities in cultured human spinal cord neurons. *Neurology*. 1986;36:573–6.
- Nagaraja TN, Gourie-Devi M, Nalini A, Raju TR. Neurofilament phosphorylation is enhanced in cultured chick spinal cord neurons exposed to cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neuropathol*. 1994;88:349–52.
- Rao MS, Devi MG, Nalini A, Shahani N, Raju TR. Neurofilament phosphorylation is increased in ventral horn neurons of neonatal rat spinal cord exposed to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegeneration*. 1995;4:397–401.
- Couratier P, Hugon J, Sindou P, Vallat JM, Dumas M. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet*. 1993;341:265–8.
- Terro F, Lesort M, Viader F, Ludolph A, Hugon J. Antioxidant drugs block in vitro the neurotoxicity of CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*. 1996;7:1970–2.
- Manabe Y, Kashihara K, Shiro Y, Shohmori T, Abe K. Enhanced Fos expression in rat lumbar spinal cord cultured with cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*. 1999;21:309–12.
- Shahani N, Gourie-Devi M, Nalini A, Rammohan P, Shobha K, Harsha HN, et al. (-)-Deprenyl alleviates the degenerative changes induced in the neonatal rat spinal cord by CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2004;5:172–9.
- Gunasekaran R, Narayani RS, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Shobha K, Nalini A, et al. Exposure to cerebrospinal fluid of sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis patients alters Na(v)1.6 and K(v)1.6 channel expression in rat spinal motor neurons. *Brain Res*. 2009;1255:170–9.
- Yáñez M, Galán L, Matías-Guiu J, Vela A, Guerrero A, García AG. CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: protection by resveratrol but not riluzole. *Brain Res*. 2011;1423:77–86.
- Miller RG, Munsat TL, Swash M, Brooks BR. Consensus guidelines for the design and implementation in clinical trials in ALS. World Federation of Neurology Committee on Research. *J Neurol Sci*. 1999;169:2–12.
- Vijayalakshmi K, Alladi PA, Sathyaprabha TN, Subramaniam JR, Nalini A, Raju TR. Cerebrospinal fluid from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients induces degeneration of a cultured motor neuron cell line. *Brain Res*. 2009;1263:122–33.
- Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1998;44:696–9.
- Vijayalakshmi K, Alladi PA, Ghosh S, Prasanna VK, Sagar BC, Nalini A, et al. Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Dis*. 2011;41:695–705.
- Shaw PJ, Eggett CJ. Molecular factors underlying selectivity vulnerability of motor neurons to degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2000;247(suppl):17–27.
- Rothstein JD, van Kammer M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1995;38:78–84.
- Bar-Peled O, O'Brien RJ, Morrisson JH, Rothstein JD. Cultured motor neurons possess calcium-permeable AMPA/kainate receptors. *Neuroreport*. 1999;10:855–9.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study group. *N Engl J Med*. 1994;330:585–91.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Powe L, Durrleman S, et al. A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. *Neurology*. 1996;47:S242–50.
- Hebert T, Drapeau P, Pradier L, Dunn RJ. Block of the rat brain IIA sodium channel alpha subunit by the neuroprotective drug riluzole. *Mol Pharmacol*. 1994;45:1055–60.
- Albo F, Pieri M, Zona C. Modulation of AMPA receptors in spinal motor neurons by the neuroprotective agent riluzole. *J Neurosci Res*. 2004;78:200–7.
- Lamanauskas N, Nistri A. Riluzole blocks persistent Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons *in vitro*. *Eur J Neurosci*. 2008;27:2501–14.
- Shahani N, Nalini A, Gourie-Devi M, Raju TR. Reactive astrogliosis in neonatal rat spinal cord after exposure to cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 1998;149:295–8.
- Shahani N, Gourie-Devi M, Nalini A, Raju TR. Cyclophosphamide attenuates the degenerative changes induced by CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis in the neonatal rat spinal cord. *J Neurol Sci*. 2001;185:109–18.
- Anneser JM, Chahli C, Ince PG, Borasio GD, Shaw PJ. Glial proliferation and metabotropic glutamate receptor expression in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63:831–40.
- Sen I, Nalini A, Joshi NB, Joshi PG. Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients preferentially elevates intracellular calcium and toxicity in motor neurons via AMPA/kainate receptor. *J Neurol Sci*. 2005;235:45–54.
- Shobha K, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Nalini A, Sathyaprabha TN, Raju TR. Altered *in-vitro* and *in-vivo* expression of glial glutamate transporter-1 following exposure to cerebrospinal

- fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2007;254:9–16.
32. Tikka TM, Vartiainen NE, Goldsteins G, Oja SS, Andersen PM, Marklund SL, et al. Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. *Brain.* 2002;125:722–31.
  33. Anneser JM, Chahli C, Borasio GD. Protective effect of metabotropic glutamate receptor inhibition on amyotrophic lateral sclerosis-cerebrospinal fluid toxicity *in vitro*. *Neuroscience.* 2006;141:1879–86.
  34. Ramamohan PY, Gourie-Devi M, Nalini A, Shobha K, Ramamohan Y, Joshi P, et al. Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients causes fragmentation of the Golgi apparatus in the neonatal rat spinal cord. *Amyotroph Lateral Scler.* 2007;8:79–82.
  35. Matías-Guiu J, García-Ramos R, Galán L, Barcia J. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia.* 2008;23: 518–29.
  36. Kinoshita Y, Ito H, Hirano A, Fujita K, Wate R, Nakamura M, et al. Nuclear contour irregularity and abnormal transporter protein distribution in anterior horn cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009;68:1184–92.
  37. Durand J, Amendola J, Bories C, Lamotte d'Incamps B. Early abnormalities in transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol Paris.* 2006;99:211–20.
  38. Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet.* 2004;75:822–31.
  39. Chen HJ, Anagnostou G, Chai A, Withers J, Morris A, Adhikaree J, et al. Characterisation of the properties of a novel mutation in VAPB in familial ALS. *J Biol Chem.* 2010;285:40266–81.
  40. Tran D, Chalhoub A, Schooley A, Zhang W, Ngsee JK. A mutation in VAPB that causes amyotrophic lateral sclerosis also causes a nuclear envelope defect. *J Cell Sci.* 2012;125:2831–6.
  41. Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP. Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. *J Cell Biol.* 1999;147:531–44.
  42. Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K. Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2011;302:14–8.
  43. Kato S. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: Similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 2008;115:97–114.
  44. Swarup V, Phaneuf D, Bareil C, Robertson J, Rouleau GA, Kriz J, et al. Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments. *Brain.* 2011;134:2610–26.
  45. Barclay M, Julien JP, Ryan AF, Housley GD. Type III intermediate filament peripherin inhibits neuritogenesis in type II spiral ganglion neurons *in vivo*. *Neurosci Lett.* 2010;478:51–5.