Prólogo

DIEGO GRACIA GUILLÉN
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina

¿Cómo se constituyen como tales los seres vivos? ¿Hay en ellos un periodo constituyente, o por el contrario quedan ya constituidos desde el primer momento y a lo largo del periodo embrionario no hacen otra cosa que madurar y crecer? Estas preguntas son tan antiguas como la propia biología, quizá como la propia especie humana. Técnicamente se le conoce con el nombre de problema de la ontogenia. Las respuestas que han monopolizado toda su historia han sido dos, la epigénesis y el preformacionismo. La vigencia de ambas ha sido muy dispar. La epigénesis se ha llevado la parte del león, al menos en la cultura occidental. Según ella, los organismos vivos no están ya constituidos con todas sus formas desde el primer momento sino que hay en ellos un periodo, más o menos largo según las especies, de conformación. A él sucede otro de crecimiento y maduración. En la embriología clásica, eso es lo que diferenciaba la fase embrionaria de la fetal. Durante la primera se constituyen las formas de sus distintos órganos, aparatos y sistemas, en tanto que durante la segunda estos órganos maduran y crecen.

Las tesis epigenéticas son muy antiguas. Se encuentran ya en los filósofos presocráticos, en los médicos hipocráticos, y sobre todo en ese insaciable investigador de la biología que fue Aristóteles. En la *Investigación sobre los animales,* éste escribe: "Cuando las mujeres han quedado embarazadas, esto se deja notar sobre todo en los flancos (pues en algunas mujeres en seguida se ensanchan y el hecho es principalmente notable en las delgadas) y en la región inguinal. Ahora bien, en los embriones de sexo masculino, su movimiento se nota de ordinario más hacia la derecha alrededor de los cuarenta días. Y cuando se trata de embrión femenino, a la izquierda y en torno a los noventa días [...] También hacia este momento el embrión empieza a definirse; en cambio antes es una masa de carne informe". (583 a 35- b 11) Hay, pues, una adquisición progresiva de las formas. Esto llevó a los tratadistas cristianos medievales a pensar que el alma espiritual no puede ser infundida por Dios en el cuerpo más que cuando éste se halla suficientemente formado, no al principio. Tal fue, por ejemplo, la tesis de Pedro Lombardo (*Sent* II, d XVII). Como es bien sabido, ése fue

el libro de texto en las Universidades durante siglos, hasta que lo sustituyó la *Summa Teologica* de Tomás de Aquino. Pero en éste nos encontramos de nuevo la tesis de la animación retardada. *Prius generatur vivum quam animal, et animal quam homo*, escribe (*S Th* I q. 118, a.2, ad 2. Cf. I q. 76, a.4, ad 3).

El preformacionismo no surgió hasta el siglo XVII, más exactamente, hasta 1620. En ese año, el médico flamenco Thomas Fienus (Feyens) defendió la tesis de que el semen necesita sólo tres días para transformar la sangre a través de su acción coaguladora y preparar así la recepción del alma racional. Al año siguiente, en 1621, Paolo Zacchia, un médico romano, adoptó una tesis muy similar, afirmando que el alma racional era infundida en el momento de la concepción. Su opinión ganó fuerza el año 1644, cuando el papa Inocencio X le confirió el título de Protomédico General de los Estados Pontificios. Por otra parte, en 1667, el danés Niels Stensen describió los ovarios como tales (y no como testículos femeninos, según la opinión clásica) y los atribuyó un papel activo en la reproducción, de modo que la hembra dejó de tener una función pasiva, aportando sólo materia o alimento. Añádase a esto que Van Leeuwenhoek descubrió al microscopio, en 1678, los espermatozoides. Algunos años más tarde, en 1683, Leeuwenhoek sugirió que la vida comenzaba cuando un espermatozoide masculino impregnaba un óvulo.

Estas fueron las bases sobre las que se asentó la teoría "preformacionista", para la que todas las formas orgánicas están presentes ya desde el primer momento en el nuevo ser, de tal modo que la embriogénesis es un puro proceso de maduración y crecimiento. El preformacionismo adquirió pronto dos versiones, llamadas, respectivamente, "ovismo" y "animalculismo" o "espermismo" El preformacionismo ovista consideraba que todas las formas procedían del óvulo femenino, y que el esperma actuaba sólo como estímulo para el proceso de desarrollo. Por el contrario, el animalculismo sostenía que en la cabeza del espermatoziode estaba ya preformado todo el nuevo ser (*animalculus)*, bien que en miniatura. En el caso del ser humano, el *animalculus* fue denominado *homunculus,* hombrecillo. La tesis ovista defendió no sólo la preexistencia de todas las formas en el óvulo femenino, sino que como el número de óvulos de un ovario permanece invariable desde el comienzo, se vio obligada a considerar que todos los seres humanos estaban preformados en los ovarios de sus predecesoras, y por antonomasia en los ovarios de Eva. Así sucedió que el fisiólogo A. von Haller calculara que en Eva estaban contenidos 200.000 millones de seres humanos. Ni que decir tiene que para los animalculistas algo parecido sucedía con los testículos de Adán, aunque no tan categórico, ya que los espermatozoides se reproducen a lo largo de toda la vida del ser humano.

La teoría preformacionista tuvo enorme repercusión filosófica, sobre todo a través de la filosofía de Leibniz. Este autor defendió la existencia de unas realidades elementales completamente autosuficientes y dotadas de dinamismo interno desde el primer momento, de modo que nunca podían adquirir nada proveniente del exterior. Las denominó "mónadas" Las mónadas tenían todo preformado. De ahí que en el caso de las mónadas propias de los seres vivos, Leibniz defendiera una preformación total. Esta tesis pasó a los tratados de sus discípulos, en especial de Christian Wolff, el gran sistematizador de la enseñanza escolar de la filosofía en la Alemania del siglo XVIII, y por extensión en toda Europa. La influencia del sistema de Leibniz-Wolff fue enorme en toda Europa, pero sobre todo en el pensamiento escolástico de los siglos XVIII y XIX. La llamada neoescolástica ha sido desde entonces una mezcla de tomismo medieval y leibnizianismo moderno. A ello se debe, en buena medida, la pervivencia en ese medio, prácticamente hasta el día de hoy, de las tesis preformacionistas.

El preformacionismo tuvo una vigencia prácticamente total a lo largo de un siglo, desde mediados del siglo XVII hasta mediados del siglo XVIII. A partir de ese momento comenzó a resurgir la idea de que los seres vivos se van configurando progresivamente, si bien ahora a partir de las que comenzaron a denominarse hojas germinativas o blastodérmicas. El artífice de este cambio fue C. F. Wolff, quien estudiando el desarrollo del huevo del pollo constató que en él no había nada preformado, y que lo primero en aparecer era una placa lisa que más tarde se plegaba, fusionando sus bordes y apareciendo de este modo dos partes, una externa y convexa y otra interna o cóncava. De esta última derivaban las vísceras y de la primera las estructuras de las restantes partes del organismo.

El paso siguiente lo daría Mendel en 1866, al descubrir las leyes de transmisión de los caracteres hereditarios. Sus estudios sobre hibridación en plantas demostraron claramente que ciertas unidades de información se hallaban preformadas en los progenitores y se transmitían sin variaciones a sus descendientes. Habida cuenta de que Mendel era un sacerdote católico, cabría pensar que él interpretaría esas unidades básicas de la herencia, los genes, como directamente creadas por Dios, y que por lo tanto defendería un preformacionismo estricto, similar al de los grandes teóricos de la segunda mitad del siglo XVII. Pero esto, sorprendentemente, no fue así. Por lo pronto, el argumento de la "creación" no aparece nunca en sus escritos, ni aun en las ocasiones en que cabría esperarlo. Y sí hay datos indirectos que parecen indicar que él interpretó sus propios hallazgos como un paso más en la comprensión del mecanismo evolutivo de los animales y las plantas. No es un azar que en las "consideraciones preliminares" de su primer artículo escribiera a propósito de sus propios hallazgos: "Esta es la úni-

ca vía correcta que puede llevarnos finalmente a resolver una cuestión cuya importancia no cabe desconocer en relación con la historia de la evolución de las formas orgánicas". Convergente con éste son otros datos de no menor relevancia, el conocimiento que tenía de las teorías biológicas de Goethe, a través de su compañero en el monasterio, T. Bratanek, y de las doctrinas de la *Naturphilosophie*, tanto por otro monje de su convento, M, Klácel, como por uno de sus más ilustres y famosos maestros en la Universidad de Viena, Franz Unger.

Con el descubrimiento de las leyes genéticas, en cualquier caso, se ponían las bases de un nuevo preformacionismo. Los caracteres de los seres vivos, lo que a partir de Johannsen se denominarían rasgos fenotípicos, eran la expresión del llamado genotipo. La relación parecía en principio lineal. Pero en 1924 Spemann descubrió que ciertas estructuras biológicas no se desarrollaban cuando se lo impedía su relación espacial con otras que actuaban como inductoras. El resultado fue la introducción del concepto de "inductor", del que se ha dicho que es a la biología del desarrollo lo que el de gen a la genética. Diez años más tarde, en 1934, Morgan puso en relación genes e inductores, afirmando que los genes son responsables del desarrollo, pero que ciertas sustancias protoplasmáticas afectan a la actividad de los genes. De este modo, la inducción de Spemann se convertía en "inducción genética". A partir de ese momento se inició la búsqueda de inductores genéticos. El primer inductor químico que se encontró fue el azul de metileno, identificado por Needham, Brachet y Waddington en 1936. La embriología del desarrollo alcanzaba, así, su primera expresión madura.

¿Preformacionismo o epigénesis? A la altura de los años cuarenta del siglo pasado, esa dualidad se había transformado en esta otra: genes e inductores. El concepto de inducción genética tendía un puente entre ambos. Pero a partir de los años cuarenta el debate se desplazó a un nuevo nivel, el molecular. En 1944, Avery, McLeod y McCarty descubrieron que una molécula de ADN podía transferir por sí sola una alteración heredable específica a una bacteria. Unos años más tarde, Boivin indicó que las moléculas de ADN podían conferir caracteres heredables a una bacteria. Esto llevó a la conclusión de que el material hereditario debía estar contenido en los cromosomas. De este modo, se disparó el estudio de esas estructuras y de los ácidos nucleicos que había en su interior. Con ello, se iniciaba el paso de la llamada genética clásica a la genética molecular. Poco a poco, se fue conociendo el modo como se hallaba codificada la información en el ADN, y también las vías por las que esa información se expresaba, dando lugar a los aminoácidos y las proteínas. Beadle y Tatum propusieron en 1941 la hipótesis "un gen, un enzima", que después se convirtió en "un gen, una proteína". Los ulteriores descubrimientos de la biología molecular parecie-

ron confirmar esta hipótesis, que llegó a convertirse en un auténtico dogma, lo que condujo a un nuevo auge del preformacionismo, ahora de base molecular. De hecho, en la década de los años sesenta fue frecuente el argumento de que en el ADN está toda la información constitutiva de los seres vivos, de modo que todo el desarrollo posterior tiene carácter meramente consecutivo. Hubo que esperar algunos años más para que se empezara a conocer con alguna precisión la base molecular de los fenómenos de inducción, y de ese modo se iniciara el estudio molecular de los procesos de desarrollo.

Un descubrimiento fundamental en el conocimiento de la expresión genética y su regulación fue el alcanzado por François Jacob y Jacques Monod el año 1961. Ese trabajo, y otros convergentes con él, demostraron que el genoma contiene, además de genes estructurales que especifican la secuencia de aminoácidos, otros genes controladores y operadores, que pueden ser puestos en acción, es decir, activados o reprimidos, por factores o inductores externos. A partir de aquí era posible dar una interpretación biológico-molecular del fenómeno de la inducción. Surgió así el concepto de "inducción genético-molecular". Hay inductores externos al genoma, e incluso a la célula y al propio embrión, y que tienen carácter inespecífico. Como no pueden actuar en cualquier momento, poseen además un "tiempo de competencia" determinado, que es distinto en cada proceso de inducción. De lo que se deduce que el desarrollo puede seguir vías distintas, según los inductores que actúen sobre el sistema y el momento en que lo hagan. El desarrollo embrionario es cualquier cosa menos un proceso determinista. Tiene muchas vías posibles, y el que tome una u otra dependerá de factores que no son sólo genéticos sino también ambientales. Lo que sí sucede es que ciertas vías del desarrollo son más estables o equilibradas que otras, más homeostáticas, por utilizar la expresión de Waddington, razón por la cual tienen una mayor viabilidad epigenética. Ellas son las que darán lugar a un organismo estable o viable. Cuando la inestabilidad es muy grande, el resultado es la inviabilidad, la muerte. Cuando, por el contrario, la inestabilidad resulta compatible con la vida, lo que se produce es una enfermedad.

De este modo, adquiere nueva relevancia científica la vieja doctrina de la epigénesis. De hecho, el término "epigenética" fue introducido por Waddington el año 1947 en la nueva biología del desarrollo. Con él quiso significar "la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos, interacciones que dan el ser al fenotipo". La epigenética no se identifica con la vieja epigénesis, precisamente porque parte de la teoría genética, y acepta por ello una cierta preformación. Esta preformación tampoco es ya la antigua. Más que de preformación, hoy cabe hablar de "preinformación", la información

que previamente al desarrollo epigenético está codificada en los genes. En efecto, el desarrollo está en muy buena medida dirigido por genes, que por eso mismo se llaman organizadores y reguladores. De este modo, el gen fabrica su propio ambiente. De la interacción de esa información genética con la información proveniente del medio surgirá el fenotipo del nuevo ser.

Era preciso llegar aquí para situar adecuadamente este libro, un libro sobre la acción de las hormonas en el desarrollo y funcionalismo cerebral. En sus páginas puede encontrar el lector datos y más datos que demuestran la importancia de los factores extragenéticos en el desarrollo de los seres vivos, especialmente los mamíferos, y por tanto también en el ser humano. Estos factores son de diverso tipo. Hay unos, muy importantes, que son los alimentarios. Con los alimentos ingerimos productos que son fundamentales para la expresión correcta de los genes. Tal es el caso, bien conocido, de un oligoelemento, el ácido fólico, tan importante para la expresión correcta de los genes encargados del cierre de la cresta neural. Pero la coordinadora de este volumen, Ana María Pascual-Leone, así como el coordinador José Mª Medina, han querido poner el acento en otros factores de importancia no menor y sobre los que quizá se habla menos. Se trata de las hormonas, tanto de las hormonas del propio embrión como de las hormonas maternas. Su importancia es suma. Los genes necesitan un medio interno adecuado para poder expresarse, y ese medio se lo proporcionan, en parte, las hormonas. Si los alimentos son una aportación fundamental del medio externo, las hormonas lo son del interno. Uno y otro son el contexto que necesita la información genética para poderse expresar adecuadamente. La fascinación ante los grandes descubrimientos de la genética molecular, hace a veces olvidar estos otros factores que resultan tan decisivos como aquéllos en el logro de un ser vivo realmente adaptado a su medio. Los genes contienen, desde luego, información necesaria, pero sin duda no suficiente.

Nos preguntábamos al principio si preformacionismo o epigénesis. Ahora, al final, el dilema sería genética o epigenética. Y a estas alturas resulta obvio que no es posible optar por uno en detrimento del otro. Donde antes pusimos una o disyuntiva, ahora hay que escribir una y inclusiva: Genética y epigenética. Eso es lo que nos han enseñado años, décadas, siglos de paciente investigación. Bienvenida sea.

Madrid, noviembre de 2009.

1. Epigenética del desarrollo cerebral. La nueva frontera de la Neuroendocrinología

JOSÉ MARÍA MEDINA JIMÉNEZ

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL)

RESUMEN

La epigenética es un nivel superior en el complejo sistema de la regulación de la expresión génica. En este sentido, los mecanismos moleculares implicados en la regulación epigenética consisten, esencialmente, en el control de la expresión de ciertos genes mediante la metilación de las islas CpG del DNA, cercanas a sus promotores o por modificación postraduccional de las histonas mediante acetilación o metilación. Estos procesos llevan consigo el silenciamiento temporal o permanente de ciertos genes o, en su caso, su activación en el momento requerido. Es lógico que este sofisticado mecanismo se utilice durante el desarrollo y, más aún, si se trata del Sistema Nervioso, puesto que las modificaciones epigenéticas permiten la activación de aquellos genes específicos de cada tipo de célula, así como el silenciamiento permanente de los que corresponden a otro tipo celular. De hecho, la neurógenesis tiene lugar gracias a la desinhibición de los genes neurogénicos por reversión de los mecanismos epigenéticos que los mantienen silenciados en las células pluripotentes o progenitoras. Así, los factores Hes y REST mantienen inhibida la expresión de los genes neurogénicos, no sólo de la *manera tradicional*, es decir, mediante su unión a los elementos *cis* correspondientes de los promotores, sino gracias a su efecto activador de las histonas desacilasas (HDAC). En efecto, la acetilación

de las histonas provocada por la inducción de la neurogénesis expone a los genes neurogénicos a la RNA polimerasa, lo que provoca su subsiguiente transcripción. A ello contribuye, asimismo, la desmetilación específica de ciertas histonas por la acción de inhibidores de REST, tales como BRAF35. En este mecanismo intervienen numerosas proteínas efectoras, así como sRNA específicos, tales como el NRSE dsRNA y el microRNA, miR-124. Por otro lado, la *impronta* de genes, es decir, el silenciamiento permanente de un alelo, con objeto de que predomine la herencia procedente del padre o de la madre, parece jugar un papel esencial en el desarrollo del cerebro. Así, el gen de la necdina, una proteína que regula la quiescencia neuronal, está *improntado* y, por consiguiente, regulado epigenéticamente. La gliogénesis también se rige por mecanismos epigenéticos, pues la desmetilación de las islas CpG adyacentes a los promotores de los genes gliogénicos es esencial en la transición neurona-glía. Pero los procesos epigenéticos no se limitan a la regulación de la diferenciación celular, sino que intervienen, asimismo, en el desarrollo neuroendocrino, particularmente en la *sexificación* del cerebro durante el periodo perinatal. Así, el control epigenético de la expresión del gen del receptor del 17ß-estradiol, el ER2, dirige el desarrollo sexual del cerebro, puesto que señala las zonas que se verán afectadas por la hormona. Por último, diversas enfermedades de carácter epigenético afectan al desarrollo cerebral. Así, se han descrito trastornos epigenéticos relacionados con el síndrome de Prader-Willi, la enfemedad de Rett, el autismo e, incluso, con la esquizofrenia.

ABSTRACT

Epigenetic is a higher level in the regulation of gene expression. Indeed, epigenetic regulation is brought about by DNA methylation in the CpG islands adjacent to gene promoters or by post-translational histone modification caused by acetylation or methylation together resulting in control of the activity of an exclusive group of genes. In fact, epigenetic machinery is designed to silence temporally or permanently a group of genes mainly involved in development. Thus, epigenetic mechanisms act during the development of the nervous system, in which they play an important role in switching on genes related to a particular phenotype and in permanently silencing those genes directly involved in the development of others cell lineages. In fact, neurogenesis takes place by deinhibition of neurogenic genes, which are inactive in progenitor cells. In this context, Hes and REST inhibit the expression of neurogenic genes not only by binding to their *cis*-elements but also by upregulating histone deacylase (HDAC)

activity. Histone acetylation promoted by neurogenic signals increases gene expression by exposing promoters to RNA polymerase, resulting in the increase in transcriptional activity. In addition, neurogenic gene transcription increases due to the demethylation of specific histones caused by REST inhibitors such as BRAF35, a process in which specific sRNAs such as NRSE dsRNA and miR-124 are involved. Gene imprinting *i.e.* the permanent silencing of one allele in order to impose some genetic traits from the father or the mother, play a key role in brain development. For instances, a neuronal imprinted gene, *Ndn,* that codifies to necdin, a protein that regulates the quiescent state in post-mitotic neurons, is regulated epigenetically. In addition, gliogenesis is also regulated epigenetically because demethylation of CpG islands adjacent to promoters of gliogenic genes is mandatory in the neuron-glia transition. Epigenetic processes are also involved in the neuroendocrine development, particularly in the sex determination of the brain during the perinatal period. Thus, epigenetic regulation of the expression of 17ß-estradiol receptor gene, ER2 controls sexual differentiation of the brain since the receptor marks the areas sensitive to the hormone. Finally, some diseases such as Prader-Willi syndrome, Rett's disease, autism and schizophrenia may be due to some defects in the epigenetic machinery.

INTRODUCCIÓN

El avance en el conocimiento de los mecanismos que los seres vivos utilizan para controlar sus funciones vitales no deja de sorprendernos al constatar que, cuando se llega a conocer un nuevo sistema de regulación, inmediatamente se encuentra un nivel superior de organización que resulta ser aún más sofisticado que el anterior. Éste es el caso de la epigenética que, aunque fue definida por primera vez en 1940 por Conrad Waddington como "the interaction of genes with their enviroment, which bring the phenotype into being", no deja de ser un nivel superior de regulación, utilizado por zonas no codificantes de nuestro DNA para controlar de forma delicada y precisa la *"actividad"* de alguno de nuestros genes. Lo que quizás fascina de la epigenética es que permite comprender fenómenos hasta ahora inexplicados, tales como la impronta, la inactivación del cromosoma X y, sobre todo, la influencia del ambiente en nuestro fenotipo final. Esto último es de una especial trascendencia en un mundo darwiniano como el nuestro, en el que parece entrar una ráfaga lamarckiana sustentada molecularmente por la epigenética. En opinión de David Crews (1) "Lamarck was right but born in the wrong century". Y es que los científicos iconoclastas han visto sustentadas en ella su sospechas de que el dogma de que

somos lo que son nuestros genes presentaba claras contradicciones. Baste con recordar que la epigenética da una respuesta plausible a las diferencias fenotípicas que presentan los gemelos univitelinos con el transcurso del tiempo (véase (2)), a pesar de que compartan el cien por cien de su genoma. La trascendencia de estos descubrimientos se pone de manifiesto ante el hecho de la aparición del término *epigenoma* para denominar el estado epigenético de nuestro genoma. Es decir, para intentar definir los cambios epigenéticos que presentan nuestros genes en un momento dado. Éste es un hecho especialmente relevante si tenemos en cuenta que, aunque no son exclusivos de la especie humana, es en ésta donde los cambios epigenéticos son más relevantes. Esto último confiere a la farmacogenética el sustrato molecular que le faltaba y abre un nuevo campo para el tratamiento y prevención de enfermedades que, por su carácter genético, se consideraban incurables. Finalmente, la epigenética es una pieza clave para el estudio del desarrollo de los tejidos, ya que en cada una de sus células se necesita tomar decisiones para alcanzar su correspondiente fenotipo. Y hoy sabemos que esas pautas se toman mediante herramientas epigenéticas, que permiten el silenciamiento definitivo de aquellos genes que no corresponden con un determinado fenotipo, así como la activación de aquéllos que dotarán a cada célula de las características adecuadas. En este capítulo se revisarán las bases moleculares de la epigenética, así como los mecanismos epigenéticos que controlan la neurogénesis y gliogénesis.

1. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA EPIGENÉTICA

1.1. Metilación de las islas CpG.

Las islas CpG son regiones genómicas de entre 300 y 3.000 pares de bases con alto contenido en citosina y guanina contiguas, susceptibles de ser metiladas en la citosina. Están situadas cercanas, en la región 5', a los promotores de la mayoría (70%) de los genes humanos. En el resto de los mamíferos la incidencia de las islas es considerablemente menor (sólo 40%). Este hecho parece apoyar la idea de que estas islas han jugado un papel definitivo en el desarrollo de la especie humana. En este sentido, es indudable que la existencia de estas islas, como veremos más tarde, aumenta enormemente las posibilidades de regulación de la expresión de los genes, lo que ha conferido a la especie humana una mayor capacidad de adaptación a su hábitat. Aunque la mayoría de las islas están adyacentes a genes constitutivos, también algunos genes reguladores las poseen (3).

Sea como fuere, su número no es muy alto, lo que explicaría su especificidad teleonómica, aunque la razón de su escasez se debe a un motivo puramente estructural. En efecto, la citosina metilada (5-metil citosina) se confunde, frecuentemente, con la timina durante la replicación del DNA, lo que produce mutaciones que hacen desaparecer progresivamente las citosinas metiladas y, con ellas, las islas CpG. Este hecho explica que las islas CpG representen el 1% del total del genoma, cuando estocásticamente deberían constituir el 4%. Como hemos mencionado, las islas están situadas en las cercanías de los genes y su metilación impide la lectura del gen. De hecho, la presencia de metilaciones en estas islas indica que el gen adyacente está silenciado. En este sentido, las islas metiladas reclutan represores de la transcripción, tales como la MeCP2 ("methyl-CpG binding protein") que, al unirse a las islas metiladas, impiden la transcripción del gen. Asimismo, todo parece indicar que la islas también reclutan desacetilasas y metilasas de histonas, las cuales, como veremos más tarde, impiden la expresión del gen (véase (3)).

Las enzimas encargadas de la metilación de las islas se denominan DNA metil transferasas, de las que se conocen tres: las denominadas DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. La primera de ellas, la DMT1, tiene una alta especificidad por las citosinas ya metiladas, catalizando la metilación de las citosinas de la otra hebra. Se le denomina metilasa de mantenimiento, dado que actúa durante la replicación del DNA para mantener la metilación constitutiva y, por lo tanto, es la responsable del mantenimiento de las islas. La DNMT1 juega un papel muy importante en la impronta de genes y en la inactivación de uno de los cromosomas X en la mujer, así como en el desarrollo embrionario. La misión de las DNMT3a y DNMT3b es diferente, ya que realizan la metilación *de novo,* es decir, metilan el DNA no metilado. Este hecho sugiere que estas metilasas son las responsables del silenciamiento de genes producido por influencia del ambiente (4, 5).

1.2. Modificación postraduccional de histonas

La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en 146 pares de bases de DNA, enrolladas sobre un complejo proteico formado por un octámero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas consisten en un dominio globular y dos extremos, el carboxilo y el amino terminales, desplegados en forma de colas. La cola del amino terminal sufre modificaciones postraduccionales de acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, etc (véase (6)). La modificación más estudiada es la acetilación de la histona H3 en los aminos libres de las lisinas de las colas amino terminales. Los aminos libres de la lisina tienen una carga positiva que crea puentes iónicos con las cargas negativas de los fosfa-

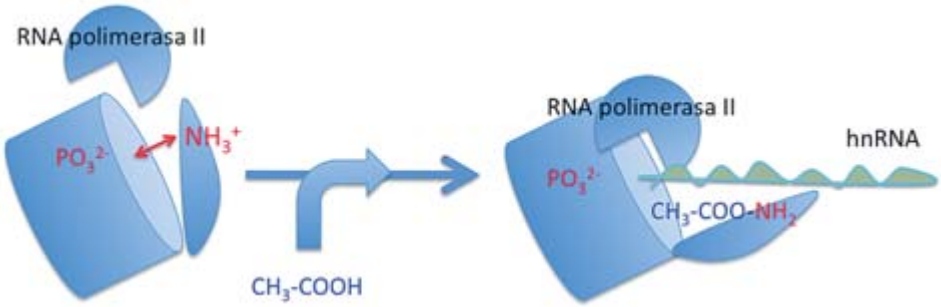


Figura 1. *La interacción del extremo amino terminal con un fosfato adyacente mantiene plegada la cola de las histonas. Sin embargo, la acetilación del extremo amino terminal despliega la cola de la histona, permitiendo la transcripción del DNA por la RNA polimerasa II.*

tos del DNA (Fig. 1). En este estado conformacional, la histona recubre al DNA haciéndolo inaccesible a la maquinaria de la transcripción. Sin embargo, si la lisina es acetilada, el enlace amida correspondiente suprime la carga del grupo amino, lo que permite la "apertura" de la cromatina y la transcripción del gen o genes implicados. Los puentes amino-fosfato también colaboran en la cohesión de los nucleosomas, por lo que la acetilación contribuye a su relajación y, por consiguiente, a la accesibilidad de los genes a la maquinaria de la transcripción. De hecho, las histonas acetiladas reclutan, a su vez, los factores de transcripción, lo que permite la formación eficiente de la maquinaria de la transcripción. La acetilación se lleva a cabo catalizada por las histona acetil transferasas (HATs), mientras que la desacetilacion está catalizada por las histona desacetilasas (HDACs).

Las histonas también se modifican mediante metilación (véase (3)) en las lisinas del amino-terminal, aunque los resultados de su metilación son más complejos. En efecto, en unos casos la metilación conduce a la activación de la transcripción, mientras que en otros se produce el silenciamiento de gen. Es más, un solo residuo de lisina puede estar mono, di o trimetilado y, en cada caso, significar activación o inhibición de la transcripción. Lo mismo podría afirmarse de la desmetilación de las histonas, que es, asimismo, muy específica.

1.3. Papel regulador de los sRNA

Los sRNA ("small RNA") son pequeños RNA no codificantes (ncRNA) que actúan como RNA de interferencia, silenciando la traducción de proteínas es-

pecíficas. Existen tres clases de sRNA que intervienen en fenómenos de silenciamiento: los siRNA ("small interference RNA), los miRNA (microRNA) y los piRNA (sRNA que interaccionan con PIWI) (7, 8).

Los más conocidos son los siRNA, puesto que son ampliamente utilizados en el silenciamiento de genes con fines experimentales. Están constituidos por 20-25 pares de bases de RNA, que proceden del procesamiento de tránscritos no codificantes de doble cadena por la Dicer, una ribonucleasa tipo III (9). Una vez procesados, se unen a los complejos RISC (citoplasmático) o RITS (nuclear). La protagonista de estos complejos es la proteína argonauta (Ago), que separa las dos hebras quedándose con la denominada *hebra líder*. Esta hebra reconoce a su complementaria entre los mRNA (RNA mensajeros) que se hayan transcrito previamente y los degrada (10). De esta manera, estos mRNA nunca llegan a traducirse, lo que resulta en la disminución de la proteína correspondiente. Además, también pueden realizar silenciamientos permanentes de genes mediante la unión a la proteína argonauta y el reclutamiento de la HDACs y DNMTs.

Por lo que respecta a los miRNA, frecuentemente denominados como miR, se sintetizan de la misma manera que los siRNA, a partir de tránscritos de doble cadena, y son reclutados por la proteína argonauta. Sin embargo, su mecanismo de acción es aún más complejo, dado que no sólo pueden inducir la degradación de mRNAs específicos (11, 12) sino que, al menos en algunos casos, regulan el espliceosoma para que se sinteticen determinados mRNAs mediante el "splicing" alternativo (13).

Finalmente, los piRNA reciben este nombre porque se unen a la proteína PIWI ("P-element induced wimpy testis") y son ligeramente más largos que los siRNA y miRNA, pues poseen entre 24 y 30 nucleótidos. No son procesados por la Dicer y la PIWI sustituye a la Ago para estos sRNAs, formando complejos de idéntica función que los formados por la Ago con los siRNAs y miRNAs, es decir, la degradación de mRNAs específicos. Aunque la función de los piRNA es la menos conocida de todos los sRNAs, se conoce que son muy activos durante la espermatogénesis, posiblemente para destruir los transposomas que pudieran estar activos durante este proceso (8).

2. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA NEUROGÉNESIS

Aparentemente, la neurogénesis es el resultado de la lucha de genes a favor y en contra de la diferenciación neuronal y cuyo resultado es la aparición

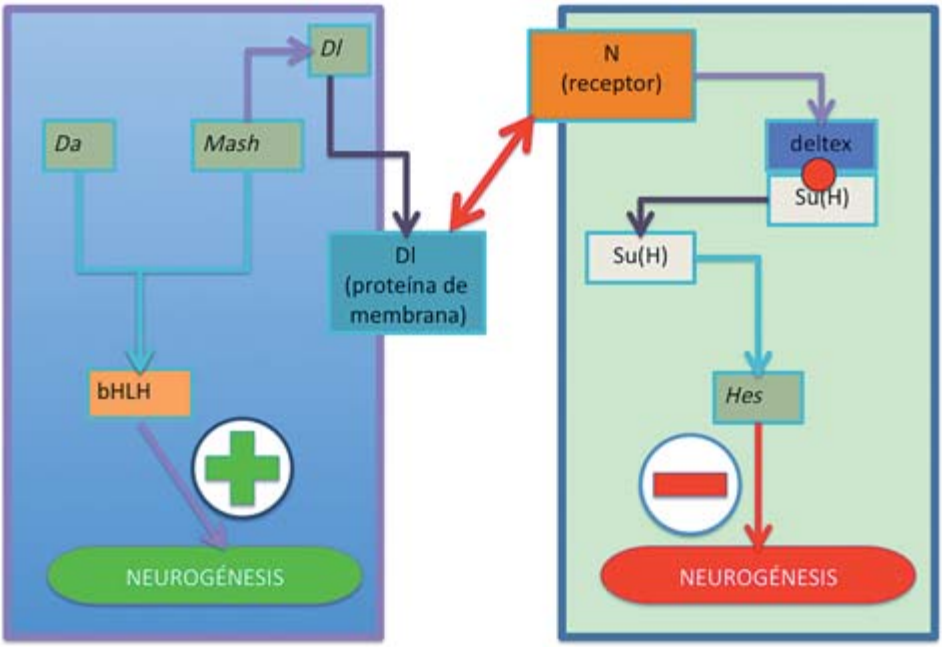


Figura 2. *La neurogénesis se inicia con la activación de los genes Mash y Da, que codifican factores de transcripción de tipo bHLH, responsables del inicio de la neurogénesis. Sin embargo, la sobreexpresión de Mash induce al gen Dl, que codifica la proteína del mismo nombre. La Dl está situada en el exterior de la membrana e interacciona con los receptores N de las células adyacentes, transmitiendo la señal de liberación de Su(H) por parte de deltex. Por último, Su(H) activa el gen Hes, con la consiguiente inhibición de la neurogénesis. Da: "daughterless"; Mash: "Mammalian achaete-scute homolog"; Dl: "delta"; N: "notch"; Su(H): "supressor of hairless"; Hes: E(Split), "Enhancer of split".*

de un número discreto de células, que por su destino neural se denominan neuroblastos. En efecto, todo parece indicar que los genes del complejo *Mash* ("mammalian achaete-scute homolog") y los *Da* ("daughterless") y *NeuroD* (homólogo del gen *Ato*: "atonal" de *Drosophila*) son los responsables de la diferenciación del ectodermo en neuroepitelio, mientras que los *N* ("Notch"), *Bib* ("big brain") *Dl* ("delta"), así como los *Mam* ("mastermind"), *Neu* ("neuralized") y, muy particularmente, *Hes* ("enhacer of split complex") y *REST* ("R1-silencing transcription factor") se oponen a tal transformación, impidiendo la expresión de aquellas proteínas que dirigen la diferenciación neural.

Sin embargo, esta aparente lucha entre genes es mucho más compleja, puesto que los principales genes a favor de la neurogénesis, es decir, los *Mash*, acti-

van también en cascada los *Dl* y *Hes*, genes que son claramente supresores de la diferenciación del ectodermo en neuroepitelio. Esta aparente paradoja se resuelve si contemplamos el proceso dividido en dos etapas y en dos células diferentes. En la primera, se inducen los genes proneurales *Da* y *Mash* (Fig. 2), cuyos productos de expresión son bHLH ("basic helix-loop-helix"), es decir, proteínas nucleares pertenecientes a los factores de transcripción de la familia HLH, llamados así por su estructura terciaria característica. Pues bien, estos factores de transcripción inducen la expresión de las proteínas neurales, mientras que inhiben la síntesis de todas aquéllas de carácter puramente ectodérmico. Sin embargo, en una segunda etapa, la sobrexpresión de *Mash* activa al gen *Dl*, que codifica la proteína Dl, una proteína con repeticiones EGF, que está situada en el exterior de la membrana celular. Cuando la proteína DL interacciona con el receptor N (codificado por el gen *"Notch"*) de una célula adyacente, se libera la proteína Su(H) ("supressor of hairless") de su secuestro por parte de la deltex. La Su(H) liberada induce el gen *Hes* y, posiblemente, los *Mam* y los *Neu*, todos ellos inhibidores de la neurogénesis (Fig. 2). Con estos datos se puede conjeturar que la interacción entre la proteína de membrana Dl y el receptor N puede que tenga lugar entre diferentes células que, al "reconocerse", evitan la diferenciación de la adyacente. De esta manera se limitaría la neurogénesis, con objeto de generar una zona discreta para el neuroepitelio. Así, en un primer momento se activarían los genes *Mash*, lo que llevaría a un grupo de células a diferenciarse en neuroblastos. Sin embargo, transcurrido cierto tiempo, la subsiguiente activación de los genes *Dl* y *Hes* prohibiría la diferenciación de las células vecinas, creando una solución de continuidad entre el ectodermo y el neuroepitelio. Se trata, por consiguiente, de una lucha de los genes que promueven la neurogénesis contra aquéllos que se oponen a ella. Esto es lógico si se piensa que, con excepción de las células del tejido nervioso, las células de los demás tejidos tienen que prohibir la expresión de los genes neurogénicos, so pena de comenzar un proceso diferenciador que las conduciría por el camino no deseado y, en el mejor de los casos, a la apoptosis.

2.1. Desinhibición de la neurogénesis

Para evitar que se active de manera fortuita, la neurogénesis está inhibida de manera redundante en los progenitores neurales. Así, los factores de transcripción de los grupos Hes ("enhancer of split") e Id ("inhibitor of DNA binding") inhiben la neurogénesis a través de la inhibición de la transcripción de los genes proneurales *Mash y Ngn (neurogenina)*. Los Hes inhiben la neurogénesis a través de dos mecanismos (Fig. 3). Por un lado, actúan del modo *clási-*

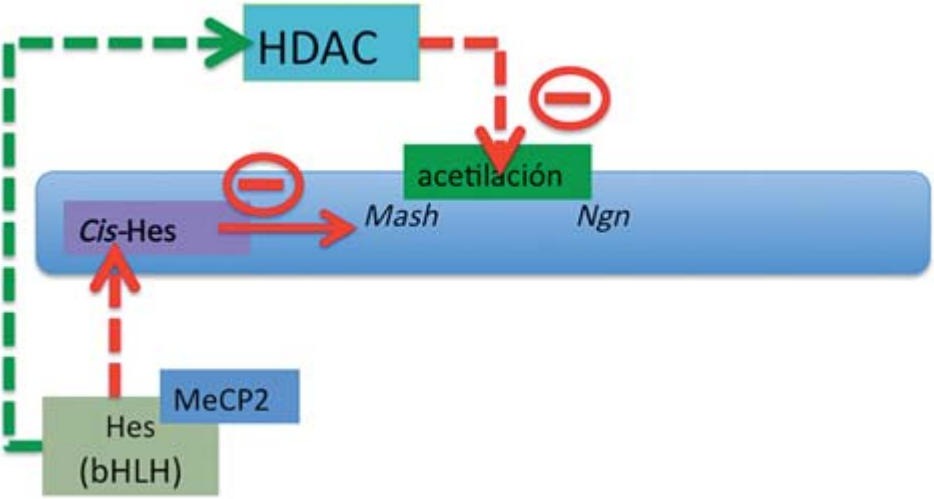


Figura 3. *La inhibición de la neurogénesis por Hes se lleva a cabo por tres mecanismos superpuestos. Por un lado, Hes se une a su elemento cis-Hes del DNA, impidiendo la transcripción de los genes neurogénicos Mash y Ngn. Por otro lado, libera a la MeCP2, que, en su forma disociada, se une a las islas CpG inhibiendo la transcripción. Por último, Hes inhibe la transcripción del DNA al inhibir la acetilación de las histonas por la HDAC. Hes: E(Split), "Enhancer of split"; MeCP2: "methyl-CpG binding protein 2"; HDAC: "histona desacilasa 2"; Mash: "Mammalian achaete-scute homolog"; Ngn: "Neurogenin".*

co, es decir, inhiben la transcripción de los genes proneurales por interacción con el promotor en los elementos *cis* correspondientes, en este caso, los denominados *cis*-Hes. Por otro lado, actúan a través de mecanismos epigenéticos mediante la activación de las HDACs. Esto último resulta en la hipoacetilación de las histonas relacionadas con los promotores de los genes proneurales *Mash y Ngn*, lo que previene la neurogénesis precoz. Por lo que respecta a los Id, el mecanismo de inhibición es diferente. Así, los Id no se unen *per se* al DNA, sino que, por el contrario, impiden la unión de los bHLH proneurales a sus elementos *cis* en el promotor, lo que resulta en la inhibición de la neurogénesis (14).

Otro importante inhibidor de la neurogénesis es REST ("R1 silencing transcription factor", también conocido como NRSF: "neuron-restrictive silencer factor"), que se une a los elementos *cis*-RE1 (15, 16) de los promotores de los genes proneurales *Mash* y *Bndf* (Fig. 4). El REST es un factor de transcripción inhibidor (17, 18), que se une al elemento RE1 del promotor mediante ocho dedos de Zinc. Por su extremo amino-terminal se une a mSin3 que, a su vez, recluta HDACs, formando un complejo represor. En este sentido, la acción de

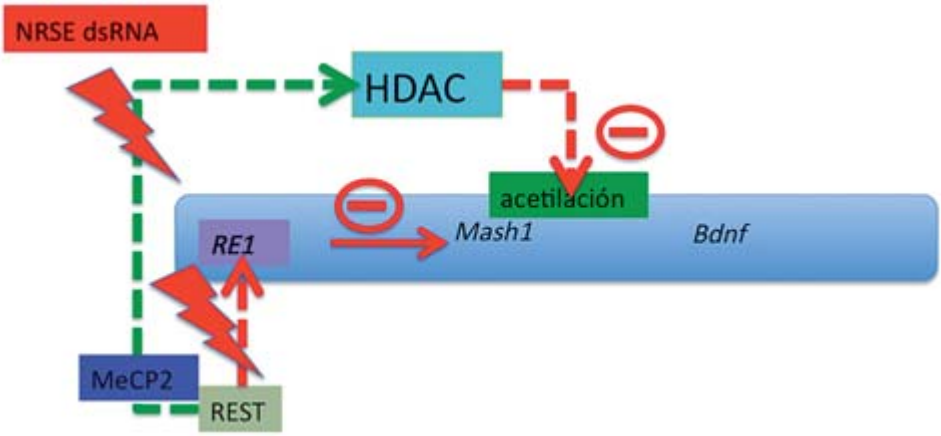


FIGURA 4. *El NRSE dsRNA es un sRNA que activa la neurogénesis al inducir la degradación de REST, lo que suprime la inhibición de la transcripción de los genes neurogénicos producida por su interacción con el elemento RE1. Sin embargo, el efecto del dsRNA va más allá, dado que la ausencia de REST libera a la MeCP2 de las islas CpG y activa a la HDAC y ambos fenómenos conducen a la inducción de la transcripción de los genes neurogénicos. REST: "R1 silencing transcription factor"; MeCP2: "methyl-CpG binding protein 2; NRSE dsRNA: "neuron-restrictive silencing element double strand RNA"; HDAC: "histona desacilasa 2"; Mash: "Mammalian achaete-scute homolog"; Bdnf: "Brain derived neurotrophic factor".*

REST requiere siempre la actividad de las HDACs, puesto que la inhibición de las HDACs promueve *per* se la neurogénesis. Por su extremo carboxilo-terminal el REST se une al CoREST, un correpresor que recluta HDACs, LDS1 (histona H3 (lisina 4) desmetilasa) y G9A (histona H3 (lisina 9) metiltransferasa), formando un complejo silenciador de genes (17, 18). De hecho, el mecanismo de regulación de la neurogénesis por REST es muy complejo.

La inhibición de la actividad de REST se lleva a cabo por degradación postranscripcional, por inhibición de su transcripción causada por ácido retinoico (18), por inhibición de las HDACs o, finalmente, por interacción con sRNAs, dependiendo, posiblemente, de la región del Sistema Nervioso de que se trate. Sea como fuere, la inactivación de REST coincide con su liberación del elemento RE1 y la inducción de genes neurogénicos, tales como *Mash1*. Por otro lado, la inducción de la neurogénesis coincide con el aumento de NRSE dsRNA ("neuron-restrictive silencing element double strand RNA"), un microRNA de doble cadena (Fig. 4). La interacción de NRSE dsRNA con REST causa la liberación de los factores represores unidos a las islas CpG, tales como la MeCP2 ("methyl-CpG binding protein 2") y la inhibición de las HDACs, lo que pro-

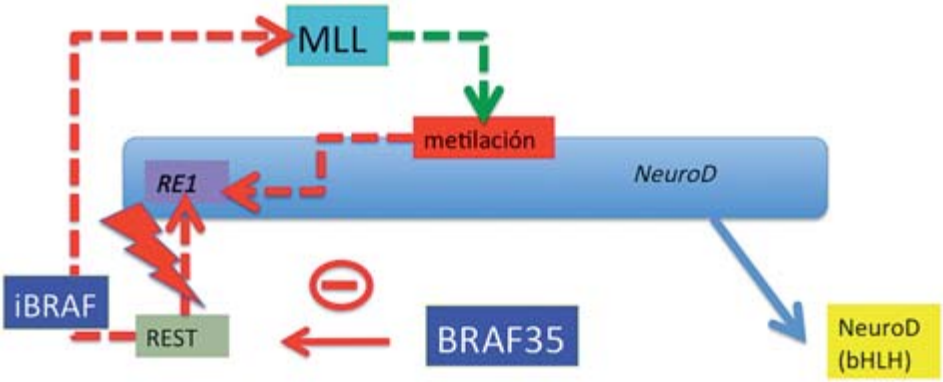


Figura 5. *La inducción de la síntesis del inhibidor de REST, BRAF35, activa la neurogénesis, no sólo por liberar a REST del elemento RE1, sino porque unido al iBRAF recluta a la MLL, una metilasa específica de la histona H3K4, lo que promueve la transcripción de los genes neurogénicos, REST: "R1 silencing transcription factor"; BRAF35: "BRAC2 associated factor 35" (BRAC2: "Breast cancer type 2 susceptibility protein"); iBRAF: proteína inhibidora de BRAF35; MLL: "myeloid lymphoid leukemia", también llamado trithorax, es una metilasa específica de la histona H3K4; NeuroD: gen neurogénico que codifica un factor de transcripción del tipo bHLH y que es homólogo del gen Ato: "atonal" de Drosophila.*

mueve la acetilación de las histonas. Así, el antisentido del NRES dsRNA inhibe la neurogénesis en los progenitores, lo que sugiere que la inducción del NRSE dsRNa es imprescindible para la neurogénesis. Por último, la actividad de REST se reduce por la expresión de BRAF35 ("BRAC2 associated factor 35" y BRAC2: "Breast cancer type 2 susceptibility protein"), un correpresor de REST (Fig.5). BRAF35 desplaza a iBRAF (proteína inhibidora de BRAF35), que estaba unida a REST y forma con él un heterodímero BRAF35-iBRAF. Este nuevo complejo recluta a la MLL ("myeloid lymphoid leukemia"), una histona metil transferasa específica de la histona H3K4. Todo ello resulta en la inhibición de REST y la inducción de genes neurogénicos, tales como *NeuroD* (Fig. 5).

2.2. Activación de los genes proneurales

La neurogénesis se inicia con la inducción de los factores de transcripción bHLH proneurales, tales como las neurogeninas (Ngn1 y Ngn2), NeuroD, Mash1, NDRF ("NeuroD-related factor") y Nex (también llamado MATH2). Estos factores de transcripción forman heterodímeros con la E2A, una proteína ubicua, y se unen a sus elementos *cis*-E de los promotores, poniendo en funcionamiento el

programa neurogénico. La inducción de estos factores de transcripción coincide con cambios sustantivos en las marcas epigenéticas. Así, en los alrededores del promotor de *Mash1* disminuye la metilación de ciertas histonas (H3K27me3), mientras que aumenta la acetilación de otras (H3K9), lo que, en su conjunto, resulta en la expresión de *Mash*. Por otro lado, los bHLH proneurales promueven la diferenciación neuronal a través de BAF ("Brg/Brm-associated factor"), un complejo remodelador de cromatina similar a SWI/SNF (Switch/Sucrose Non Fermentable") de levaduras. Así, Ngn1 y NeuroD se unen a Brg1 ("Brahma-related gene 1"), una ATPasa del complejo BAF y promueven la differenciación neuronal. La unión de Ngn1 y neuroD con BAF coincide con cambios en otras subunidades de BAF relacionadas con la diferenciación neuronal (19, 3).

Además del NRSE dsRNA antes mencionado, otros microRNAs intervienen en la diferenciación neuronal. Así, el miR-124, un microRNA específico del cerebro, aumenta progresivamente durante la diferenciación neuronal (20, 3), persistiendo en las neuronas maduras. Por lo que conocemos hasta el momento, el miR-124 promueve la diferenciación neuronal a través de dos mecanismos. El primero de ellos consiste en la regulación del espliceosoma, de tal manera que su presencia promueve la permanencia de los exones proneurales. Este proceso se lleva a cabo gracias a que el miR-124 promueve la expresión de PTBP2, un inhibidor de PTBP1, que es el causante de la eliminación de los exones proneurales. El segundo de esos mecanismos consiste en la inducción, por miR-124, de la degradación de uno de los componentes no proneurales de REST, tales como la SCP1 ("small C-terminal domain phosphatase 1"). De hecho, la SCP1 está presente en las células no neurales con objeto de inhibir los genes proneuronales (21, 22). Todo esto explica cómo la sobreexpresión de miR-124 produce la expresión de *Ngn2* y *NeuroD*, lo que causa la diferenciación precoz de las neuronas. Asimismo, el promotor del miR-124 tiene elementos *cis*-RE1, por lo que su transcripción se inhibe por REST. Este hecho sugiere que, una vez que la transcripción del miR-124 se inicie, la inhibición de REST potenciará la transcripción de miR-124, iniciando la neurogénesis. Es necesario resaltar que otros miRNAs (miR-200 y miR-133b) también intervienen en la neurogénesis, aunque lo hacen en neuronas específicas y por mecanismos que aún no conocemos en detalle.

3. REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA TRANSICIÓN NEURONA-GLÍA

La conversión del ectodermo en neuroepitelio lleva consigo el cambio del destino celular hacia células proneurales. Esta transición tiene lugar muy al principio

del desarrollo ontogénico, cuando se crea la placa neural. Pues bien, cuando, acto seguido, la placa se pliega para formar el tubo neural, tiene lugar la primera diferenciación de los progenitores neurales. Así, las células de la placa que quedan en el exterior del tubo neural, las denominadas células de la cresta, van a dar lugar al Sistema Nervioso Periférico, gracias a su transformación en progenitores específicos. Esta transición está inducida por el GGF ("glial growth factor") e incluye la inducción de genes tales como *Wnt* ("wingless integration site"), *En* ("engrailed"), *Pnt* ("pointed") y *Gcm* ("glia cell missing"). Sin embargo, las células restantes, es decir las células que conforman el tubo neural, siguen otro camino con objeto de desarrollar el Sistema Nervioso Central. De hecho, a lo largo del desarrollo del Sistema Nervioso, los progenitores neurales se transformarán en neuronas por el complejo mecanismo mencionado anteriormente o virarán hacia progenitores gliales, dando lugar a los astrocitos y a los oligodendrocitos. Posiblemente, la diferenciación entre astrocitos y oligodendrocitos se lleva a cabo a través de unos progenitores secundarios demominados O2A ("oligodendrocyte-type 2 astrocyte"), aunque la presencia de estos últimos no ha podido demostrarse *in vivo*. Este proceso comenzaría por la generación de astrocitos tipo 1 y progenitores O2A a partir de los progenitores gliales. Posteriormente, los O2A generarían oligodendrocitos gracias a la NT-3, una neurotrofina liberada por los astrocitos tipo 1, o bien astrocitos tipo 2 por acción del CNTF ("ciliary neurotrophic factor").

Sin embargo, la primera decisión que deben tomar los neuroblastos del neuroepitelio es si formarán neuronas o se transformarán en progenitores gliales. En este sentido, los factores bHLH proneurales cumplen también una función esencial en la transformación de neurona en glía. Así, la expresión de *Ngn1* inhibe el efecto gliogénico del CNTF, impidiendo la generación de astrocitos (23). Este efecto no es directo, sino a través de un mecanismo epigenético consistente en el secuestro de la CBP/p300, una histona acetil transferasa, así como de la Smad1, una proteína intermediaria de la señal de las BMPs ("bone morphogenic proteins") (Fig.6). Esto último dificulta las interacciones de estos factores con STAT3 ("signal transducer and activator of transcription 3"), un complejo cuya actividad es esencial para la gliogénesis (24, 25).

Por otro lado, antes de iniciarse la gliogénesis la MeCP2 ("methyl-CpG binding protein") está unida a las islas CpG cercanas a los promotores de *Gfap, Stat1* y *S100B* pero no en *Stat3* (26, 27). Sin embargo, cuando la gliogénesis se inicia, la MeCP2 se une a la islas CpG cercanas a *Stat3,* liberándose de las adyacentes a *Gfap, Stat1* y *S100B* (Fig. 6). Las islas cercanas a estos últimos genes se desmetilan, lo que resulta en la transcripción de los genes gliogénicos y la consiguiente transición neurona-glía (28).

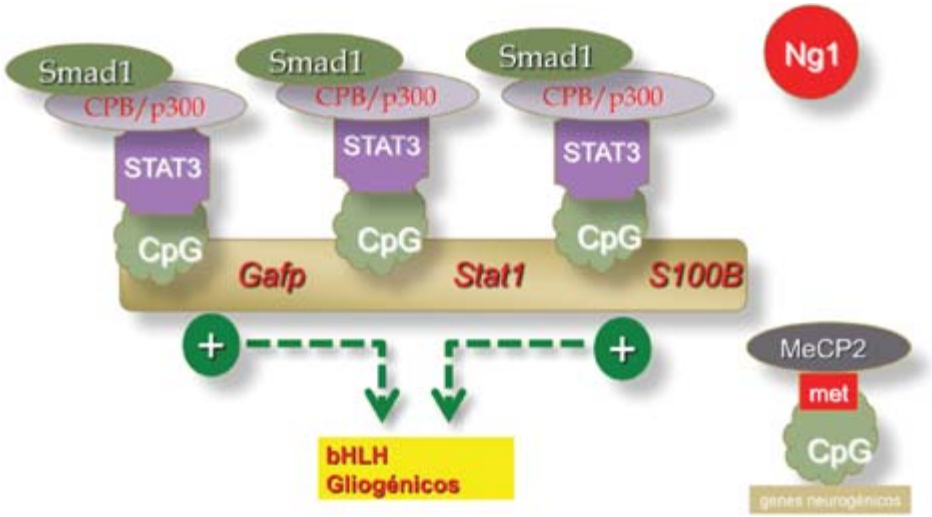


Figura 6. En el estado activado de la gliogénesis la neurogenina 1 se ha liberado y la MeCP2 se ha unido a las islas CpG metiladas adyacentes a los promotores de los genes neurogénicos. Esto permite la unión de Smad1 y CPB/p300 a la STAT3, formando un complejo que impide la metilación de las islas adyacentes a los promotores de los genes gliogénicos. El resultado es la expresión de los genes gliogénicos por acción de CNTF. Ng1: neurogenina 1;Smad1: proteína intermediaria de la señal de las BMPs ("bone morphogenic proteins"); CBP/p300: histona acetil transferasa; STAT3: "signal transducer and activator of transcription 3"; CpG: islas CpG; Gafp: gen que codifica la proteína GAFP "glial acidic fibrillar protein"; Stat1: gen que codifica la proteína "signal transducer and activator of transcription 1"; S100B: gen que codifica la proteína S100B.

4. EPIGENÉTICA DEL DESARROLLO NEUROENDOCRINO

En la mayoría de los mamíferos "no precoces" el desarrollo del cerebro se prolonga a lo largo de periodo perinatal. En el caso del hombre, el desarrollo cerebral continúa, incluso, hasta después del destete (29). Pues bien, hoy conocemos que multitud de procesos implicados en el desarrollo cerebral están regulados epigenéticamente. Y no nos referimos solamente a la regulación de la neurogénesis antes mencionada, sino al papel fundamental que juega en el desarrollo cerebral la impronta de genes, un proceso genuinamente epigenético. La impronta de genes, es decir, el silenciamiento permanente de un alelo, con objeto de que predomine la herencia procedente del padre o, en algunos casos, de la madre, está regulada epigenéticamente. De hecho, la impronta de genes se produce por la metilación de la islas CpG próximas a los promotores de los ge-

nes *improntables*, así como por la metilación de las histonas de los nucleosomas adyacentes (30). Pues bien, la mayoría de los genes improntables se expresa en cerebro (31) y muchos de ellos se regulan epigenéticamente, cumpliendo un papel fundamental en el desarrollo cerebral (32). El mejor estudiado de estos genes es el *Ndn*, que codifica la necdina, una proteína implicada en la diferenciación neuronal y posiblemente relacionada con el síndrome de Prader-Willi. De hecho, esta enfermedad está considerada como el paradigma de cómo la epigenética puede tener impacto en la función neuroendocrina (30). La necdina se expresa en el cerebro durante el desarrollo, mostrando un pico entre los días 1 y 4 postnatales, aunque también está presente en los somas neuronales durante la vida adulta (33). Aunque su función es aún desconocida, se ha sugerido que la necdina es la responsable de la entrada de la neurona en estado postmitótico y de su permanente quiescencia (34).

Por otro lado, durante el período perinatal tiene lugar el desarrollo sexual del cerebro, de tal manera que después de varias semanas de vida extruterina se observan núcleos cerebrales sexualmente dismórficos (35). Pues bien, la diferenciación sexual del cerebro se lleva a cabo por mecanismos epigenéticos (36), Así, parece probado que en animales de experimentación el comportamiento sexual viene impuesto por cambios epigenéticos que afectan a la acción hormonal (37) y que influyen, incluso, en el metabolismo de ciertas zonas del cerebro (38). En este sentido, el desarrollo sexual del cerebro se lleva a cabo por la acción del 17ß-estradiol (E2) (39). De hecho, en las primeras semanas de vida se detectan altos niveles de unión ("binding") del E2 a ciertas zonas del cerebro en desarrollo, especialmente en el córtex y el hipocampo. Contra todo pronóstico, los niveles de unión del E2 a estas zonas del cerebro caen extraordinariamente llegada la pubertad (40). Estos altos niveles de unión del E2 a determinadas zonas del cerebro parecen determinar el desarrollo sexual del cerebro. De hecho, la masculinización del cerebro se lleva a cabo por la exposición de ciertas zonas cerebrales al E2 (41), lo que no afecta al cerebro femenino, puesto que éste se protege mediante la α-fetoproteína (42).

La unión del E2 al cerebro está condicionada por la expresión del receptor mayoritario de E2, es decir, el receptor ER2, un proceso que está regulado epigenéticamente (43). De hecho, la expresión de ER2 está señalizada a través de la vía de JAK2-Stat5 (44, 45), a través de un proceso epigenético similar al observado en la gliogénesis (véase anteriormente).

En este sentido, el aseo y cuidado de las crías por parte de la madre disminuye la metilación de las islas CpG cercanas al promotor del receptor ER2 en el área preóptica, lo que aumenta la expresión del receptor (43), un proceso genuinamen-

te epigenético. El gen ER2 tiene, al menos, seis promotores que se expresan diferencialmente dependiendo del tejido (46). En el cerebro humano el promotor tipo A está asociado al gen constitutivo, mientras que el tipo C está relacionado con el gen inducible, localizado en el hipotálamo y en la lámina V del córtex. En este sentido, se ha descrito que, en el córtex, los promotores del ER2 se metilan (47) durante el periodo postnatal, coincidiendo con la caída de la expresión del mRNA del receptor. Este hecho coincide con la unión de la MeCP2 ("methyl-CpG binding protein 2") a las islas CpG metiladas. Parece claro, pues, que la expresión del receptor de estrógenos está regulada epigenéticamente durante el período perinatal.

5. TRASTORNOS NEUROLÓGICOS DE CARÁCTER EPIGÉNÉTICO

El síndrome de Prader-Willi es una enfermedad rara de caracter neuroendocrino causada por una disfunción del eje hipotalámico/hipofisario. Los enfermos presentan bajas concentraciones séricas de testosterona y de gonadotrofinas, principalmente de LH. El déficit hipofisario se traduce en una menor secreción de GH e IGF-1. La enfermedad se caracteriza por hipotonía y dificultad para la lactancia, seguida de un apetito voraz durante la niñez. Esto último parece ser debido a la inhibición de la respuesta a la saciedad por déficit en la secreción del péptido intestinal YY. Más tarde, los enfermos presentan hipogonadismo, criptorquidia y retraso mental.

El síndrome de Prader-Willi es debido a diversas mutaciones en los genes paternos improntados de la región q11-q13 del cromosoma 15 (48). El defecto en la expresión de estos genes resulta en tres tipos de anormalidades. Las más comunes son la deleción de una parte del cromosoma paterno y la presencia de una disomía en la región materna del cromosoma. En tercer lugar, la menos común está causada por la mutación del denominado *centro de impronta*. La zona improntada del cromosoma 15 contiene numerosos genes, de los que se han caracterizado varios. Entre ellos se encuentran el gen *MKRN3,* que codifica un factor de transcripción en dedo de zinc y la región *SNURF-SNRPN* que codifica una ribonucleoproteína, además de RNA nucleolar y el gen *MAGEL2*, que codifica un factor de transcripción que se expresa exclusivamente en cerebro. Sin embargo, el más interesante desde el punto de vista del desarrollo cerebral es el gen *Ndn,* que codifica la necdina, una proteína que se expresa en las neuronas postmitóticas y que parece ser la responsable de la quiescencia neuronal, ya que no sólo impide a la neurona postmitótica la reentrada en el ciclo celular (49), sino que, además, impide la apoptosis (50, 51). Asimismo, la necdina parece estar implicada en la diferenciación y especificación de las neuronas GA-

BAérgicas (52). Por consiguiente, el síndrome de Prader-Willi es un trastorno neuroendocrino complejo, en el que están implicados uno o varios genes improntados.

El síndrome de Rett es una enfermedad que afecta principalmente al sexo femenino y que cursa con un retraso en la adquisición del lenguaje y, posteriormente, una falta de coordinación motriz acompañada de retraso mental leve. La anomalía se debe a mutaciones en el cromosoma X, en la región q28. Precisamente, en esta zona está situado el gen *MECP2*, que codifica la "methyl-CpG binding protein", una proteína que se une al RNA en la islas CpG impidiendo la expresión de ciertos genes. Por lo tanto, al menos algunos casos de Rett están ocasionados por defectos en esta proteína (53), que cumple un papel importantísimo en la regulación de la neurogénesis y de la gliogénesis (véase anteriormente).

Se ha sugerido, asimismo, que la esquizofrenia es una enfermedad de origen epigenético (54, 55). En este sentido, el receptor de estradiol, ER2, está presente en las áreas del cerebro relacionadas con la esquizofrenia (56), por lo que se ha asociado al estradiol con esta enfermedad, así como con la depresión (57, 58, 59). De hecho, los síntomas de la esquizofrenia fluctúan, en la mujer, coincidiendo con el ciclo menstrual (59)

Por consiguiente, aunque la relación entre la metilación del DNA y las enfermedades neurológicas requiere un estudio más profundo, parece fuera de toda duda que muchos de estos trastornos tiene un sustrato epigenético.

EPÍLOGO

De lo recogido en esta revisión se deduce claramente que, a pesar de las diferentes interpretaciones, la Epigenética no es más que un orden superior en la regulación de la expresión génica que, basándose en la metilación del DNA y en la modificación postraduccional de las histonas, es capaz de llevar a cabo un sofisticado mecanismo para regular la expresión de un grupo de genes, cuya actividad es necesaria para el desarrollo de un determinado fenotipo. No es extraño, por consiguiente, que los genes claves en el desarrollo del Sistema Nervioso estén regulados epigenéticamente y que del funcionamiento correcto de tales mecanismos dependa la correcta adquisición de los diferentes fenotipos celulares. Es lógico, por tanto, que en los próximos años se descubran más enfermedades de origen epigénetico, abriendo así un nuevo capítulo dentro de la Patología Molecular.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Crews, D. (2008) Epigenetics and its implications for behavioral neuroendocrinology. *Front Neuroendocrinol,* **29,** 344-357.

(2) Qiu, J. (2006) Epigenetics: unfinished symphony. *Nature,* **441,** 143-145.

(3) Hamby, M.E., V. Coskun and Y.E. Sun (2008) Transcriptional regulation of neuronal differentiation: the epigenetic layer of complexity. *Biochim Biophys Acta,* **1779,** 432-437.

(4) Wu, H. and Y.E. Sun (2006) Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatr Res,* **59,** 21R-25R.

(5) Jaenisch, R. and A. Bird (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet,* **33 Suppl,** 245-254.

(6) Turner, B.M. (2007) Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol,* **9,** 2-6.

(7) Zamore, P.D. and B. Haley (2005) Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science,* **309,** 1519-1524.

(8) Moazed, D. (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature,* **457,** 413-420.

(9) Kim, V.N., J. Han and M.C. Siomi (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol,* **10,** 126-139.

(10) Siomi, H. and M.C. Siomi (2009) On the road to reading the RNA-interference code. *Nature,* **457,** 396-404.

(11) Bartel, D.P. and C.Z. Chen (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet,* **5,** 396-400.

(12) He, L. and G.J. Hannon (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet,* **5,** 522-531.

(13) Liu, J. (2008) Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol,* **20,** 214-221.

(14) Bertrand, N., D.S. Castro and F. Guillemot (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci,* **3,** 517-530.

(15) Hakimi, M.A., D.A. Bochar, J. Chenoweth, W.S. Lane, G. Mandel and R. Shiekhattar (2002) A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA,* **99,** 7420-7425.

(16) Greenway, D.J., M. Street, A. Jeffries and N.J. Buckley (2007) RE1 Silencing transcription factor maintains a repressive chromatin environment in embryonic hippocampal neural stem cells. *Stem Cells,* **25,** 354-363.

(17) Ballas, N. and G. Mandel (2005) The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol,* **15,** 500-506.

(18) Ballas, N., C. Grunseich, D.D. Lu, J.C. Speh and G. Mandel (2005) REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell,* **121,** 645-657.

(19) Seo, S., G.A. Richardson and K.L. Kroll (2005) The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development,* **132,** 105-115.

(20) Conaco, C., S. Otto, J.J. Han and G. Mandel (2006) Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **103,** 2422-2427.

(21) Yeo, M., S.K. Lee, B. Lee, E.C. Ruiz, S.L. Pfaff and G.N. Gill (2005) Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression. *Science,* **307,** 596-600.

(22) Visvanathan, J., S. Lee, B. Lee, J.W. Lee and S.K. Lee (2007) The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev,* **21,** 744-749.

(23) Sun, Y., M. Nadal-Vicens, S. Misono, M.Z. Lin, A. Zubiaga, X. Hua, G. Fan and M.E. Greenberg (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell,* **104,** 365-376.

(24) Hsieh, J. and F.H. Gage (2004) Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev,* **14,** 461-469.

(25) Nakashima, K., M. Yanagisawa, H. Arakawa, N. Kimura, T. Hisatsune, M. Kawabata, K. Miyazono and T. Taga (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science,* **284,** 479-482.

(26) Fan, G., K. Martinowich, M.H. Chin, F. He, S.D. Fouse, L. Hutnick, D. Hattori, W. Ge, Y. Shen, H. Wu, J. ten Hoeve, K. Shuai and Y.E. Sun (2005) DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development,* **132,** 3345-3356.

(27) Teter, B., I. Rozovsky, K. Krohn, C. Anderson, H. Osterburg and C. Finch (1996) Methylation of the glial fibrillary acidic protein gene shows novel biphasic changes during brain development. *Glia,* **17,** 195-205.

(28) Takizawa, T., K. Nakashima, M. Namihira, W. Ochiai, A. Uemura, M. Yanagisawa, N. Fujita, M. Nakao and T. Taga (2001) DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell,* **1,** 749-758.

(29) Sowell, E.R., P.M. Thompson and A.W. Toga (2004) Mapping changes in the human cortex throughout the span of life. *Neuroscientist,* **10,** 372-392.

(30) Davies, W., P.M. Lynn, D. Relkovic and L.S. Wilkinson (2008) Imprinted genes and neuroendocrine function. *Front Neuroendocrinol,* **29,** 413-427.

(31) Davies, W., A.R. Isles and L.S. Wilkinson (2005) Imprinted gene expression in the brain. *Neurosci Biobehav Rev,* **29,** 421-430.

(32) Wilkinson, L.S., W. Davies and A.R. Isles (2007) Genomic imprinting effects on brain development and function. *Nat Rev Neurosci,* **8,** 832-843.

(33) Aizawa, T., K. Maruyama, H. Kondo and K. Yoshikawa (1992) Expression of necdin, an embryonal carcinoma-derived nuclear protein, in developing mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res,* **68,** 265-274.

(34) Uetsuki, T., K. Takagi, H. Sugiura and K. Yoshikawa (1996) Structure and expression of the mouse necdin gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. *J Biol Chem,* **271,** 918-924.

(35) Bleier, R., W. Byne and I. Siggelkow (1982) Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. *J Comp Neurol,* **212,** 118-130.

(36) Gore, A.C. (2008) Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol,* **29,** 358-374.

(37) Crews, D., A.C. Gore, T.S. Hsu, N.L. Dangleben, M. Spinetta, T. Schallert, M.D. Anway and M.K. Skinner (2007) Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **104,** 5942-5946.

(38) Sakata, J.T., D. Crews and F. González-Lima (2005) Behavioral correlates of differences in neural metabolic capacity. *Brain Res Brain Res Rev,* **48,** 1-15.

(39) McCarthy, M.M. (2008) Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev,* **88,** 91-124.

(40) Shughrue, P.J., W.E. Stumpf, N.J. MacLusky, J.E. Zielinski and R.B. Hochberg (1990) Developmental changes in estrogen receptors in mouse cerebral cortex between birth and postweaning: studied by autoradiography with 11 beta-methoxy-16 alpha-[125I]iodoestradiol. *Endocrinology,* **126,** 1112-1124.

(41) MacLusky, N.J. and F. Naftolin (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science,* **211,** 1294-1302.

(42) Bakker, J., C. De Mees, Q. Douhard, J. Balthazart, P. Gabant, J. Szpirer and C. Szpirer (2006) Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci,* **9,** 220-226.

(43) Champagne, F.A. (2008) Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Front Neuroendocrinol,* **29,** 386-397.

(44) Frasor, J. and G. Gibori (2003) Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends Endocrinol Metab,* **14,** 118-123.

(45) Frasor, J., U. Barkai, L. Zhong, A.T. Fazleabas and G. Gibori (2001) PRL-induced ERalpha gene expression is mediated by Janus kinase 2 (Jak2) while signal transducer and activator of transcription 5b (Stat5b) phosphorylation involves Jak2 and a second tyrosine kinase. *Mol Endocrinol,* **15,** 1941-1952.

(46) Kos, M., S. O'Brien, G. Flouriot and F. Gannon (2000) Tissue-specific expression of multiple mRNA variants of the mouse estrogen receptor alpha gene. *FEBS Lett,* **477,** 15-20.

(47) Wilson, M.E., J.M. Westberry and A.K. Prewitt (2008) Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha gene expression in the brain: a role for promoter methylation? *Front Neuroendocrinol,* **29,** 375-385.

(48) Goldstone, A.P. (2004) Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab,* **15,** 12-20.

(49) MacDonald, H.R. and R. Wevrick (1997) The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet,* **6,** 1873-1878.

(50) Andrieu, D., H. Meziane, F. Marly, C. Angelats, P.A. Fernandez and F. Muscatelli (2006) Sensory defects in Necdin deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death. *BMC Dev Biol,* **6,** 56.

(51) Kurita, M., T. Kuwajima, I. Nishimura and K. Yoshikawa (2006) Necdin downregulates CDC2 expression to attenuate neuronal apoptosis. *J Neurosci,* **26,** 12003-12013.

(52) Kuwajima, T., I. Nishimura and K. Yoshikawa (2006) Necdin promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with Dlx homeodomain proteins. *J Neurosci,* **26,** 5383-5392.

(53) Nan, X. and A. Bird (2001) The biological functions of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 and its implication in Rett syndrome. *Brain Dev,* **23 Suppl 1,** S32-37.

(54) Tamminga, C.A. and H.H. Holcomb (2005) Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Mol Psychiatry,* **10,** 27-39.

(55) Tremolizzo, L., G. Carboni, W.B. Ruzicka, C.P. Mitchell, I. Sugaya, P. Tueting, R. Sharma, D.R. Grayson, E. Costa and A. Guidotti (2002) An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **99,** 17095-17100.

(56) Perlman, W.R., E. Tomaskovic-Crook, D.M. Montague, M.J. Webster, D.R. Rubinow, J.E. Kleinman and C.S. Weickert (2005) Alteration in estrogen receptor alpha mRNA levels in frontal cortex and hippocampus of patients with major mental illness. *Biol Psychiatry,* **58,** 812-824.

(57) Chang, S.S. and D.C. Renshaw (1986) Psychosis and pregnancy. *Compr Ther,* **12,** 36-41.

(58) Freeman, M.P., K.W. Smith, S.A. Freeman, S.L. McElroy, G.E. Kmetz, R. Wright and P.E. Keck, Jr. (2002) The impact of reproductive events on the course of bipolar disorder in women. *J Clin Psychiatry,* **63,** 284-287.

(59) Gattaz, W.F., P. Vogel, A. Riecher-Rossler and G. Soddu (1994) Influence of the menstrual cycle phase on the therapeutic response in schizophrenia. *Biol Psychiatry,* **36,** 137-139.

2. Acciones cerebrales de los esteroides: estado actual de la respuesta al estrés e implicaciones en la conducta

ANA M. PASCUAL-LEONE PASCUAL

Investigador del CSIC. Académica de Número y Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

Actualmente los estudios sobre la regulación del axis hipotálamo —pituitaria —adrenal (HPA), realizados fundamentalmente en animales, centran dicha regulación en el cerebro y en lo concerniente a la respuesta al estrés. Dicha regulación es estudiada en dos vertientes: en los procesos neurobiológicos que subyacen en una situación de estrés y en los procesos cognitivos de dicha situación, los cuales determinan conductas y modos de enfrentamiento a la situación de emergencia. Se comienza, con nuevas técnicas de PET (tomografía por emisión de positrones) o imágenes funcionales por resonancia magnética fMRI, a poder extrapolar realmente dichos resultados a humano Se hacen unas alusiones sobre las interacciones en cerebro de las hormonas esteroides, gonadales y corticosuprarrenales, con una exposición resumida sobre receptores de estradiol. Se centra el estudio en las hormonas corticosuprarrenales y en su papel clave, junto con el sistema nervioso autónomo, para elaborar las respuestas a situaciones de emergencia por agentes estresantes. Se explican, sucintamente, los mecanismos moleculares que se desencadenan después de fijarse las hormonas corticales a sus dos receptores específicos: MR de mineralocorticoides y GR de glucocorticoides. Se relata la evolución histórica del concepto de estrés acuñado por Selye en 1936 y se justifican las causas por las cuales los conceptos actuales sobre la respuesta al estrés se han ampliado acuñándose el termino allostasis, etimológicamente, "equilibrio dentro del cambio" (*maintainig stability*

through change), y no forzosamente homeostasis, que seria volver al mismo equilibrio anterior a la situación de estrés. Por ello, hoy se habla de "coste allostático" (*allostatic load*) como el desgaste fisiológico que resulta de una mala adaptación a la situación de emergencia. Paralelamente, se estudian los cambios estructurales y funcionales cerebrales que provocan las hormonas del estrés en zonas cerebrales donde están situados sus receptores, además de en hipotálamo, en el sistema límbico hipocampo, amigdala y cortex prefrontal. Todo ello explica que las adaptaciones al estado de estrés no solamente sean en vertiente neuroendocrina, que aumentará en plasma los niveles de glucocorticoides, sino en conducta cognitiva que permitirá al organismo conocer y evaluar la situación de emergencia a través de los receptores MR Y GR en hipocampo, el cual almacena la memoria de los acontecimientos en colaboración con la amígdala. Finalmente, se expone cómo la programación perinatal que se produce interactuando con el genoma heredado factores ambientales, epigenéticos, determina la regulación del HPA en adulto, lo cual es clave para la respuesta al estrés y cómo existe un dimorfismo sexual en la manera de enfrentarse a él.

ABSTRACT

Recent research on the regulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal gland (HPA) axis, carried out mainly in live animals, focuses on its organizing centre in brain and the response to stress. Such regulation is addressed in two different manners: the neurobiological pathways underlying a stressful situation and the cognitive response to such situation which determines behaviour and mechanisms to face the emergency. This approach includes new techniques such as positron emission tomography (PET) and magnetic resonance by functional imaging (fMRI) in order to extrapolate results to human biology. In the present chapter interactions of steroid, gonadal and corticosuprarrenal hormones with brain are exposed together with a brief comment on estradiol receptors The main part of the chapter deals with the central role of corticoid hormones, together with the autonomous nervous system, to generate the response to emergency situations caused by stressors. The molecular mechanisms triggered after binding of corticoid hormones to their specific receptors, mineralcorticoids (MR) and glucocorticoids (GC) are briefly described. In addition, the historical evolution of the concept of stress, coined by Selye in 1936, is related together with the reasons for the extension of the current concept of response to stress to the term: allostasis, meaning "maintaining stability through change" different to homeostasis which implies returning to a condition prior

to stress. Nowadays, allostatic load is described as a physiological shred resulting from a poor adaptation to a emergency situation. In parallel, structural and functional brain changes evoked by stress hormones in cerebral areas rich in their receptors, besides hypothalamus, limbic system, hippocampus, amygdale and prefrontal cortex, are studied. All the above explains why adaptation to stress does not only involves a neuroendocrine response which will finally increase serum glucocorticoid levels, but also implies the cognitive behaviour which will permit the organism to know and evaluate the emergency situation through hippocampal MR and GR receptors that will memorize the stressful events together with the amygdale.

Finally, the perinatal programming involving interaction with genetic and epigenetic (ambient) factors that regulate, in adults, the central role of the HPA axis to the response to stress, as well as the sexual dimorphism in males and females in the mode to face the stress will be discussed.

1. PALABRAS PREVIAS

Actualmente, está absolutamente establecida la existencia de una *programacón perinatal o temprana* durante el desarrollo de los mamíferos efectuada por factores externos al organismo en desarrollo, ambientales, que interactuando con el genoma heredado dan lugar a un llamado *epignoma* (1,2,3) que es el que realmente parece regir la salud y la enfermedad en etapas adultas. Incluso en el año 2005 (4) (5) se ha creado una Sociedad Internacional con fines formativos para dicho estudio. Con todo ello, existe una ingente cantidad de bibliografía al respecto que muestra, por estudios epidemiológicos en humano (1), que la programación anómala perinatal, cuyo resultado más evidente es el bajo peso al nacimiento, subyace como desencadenante de las patologías adultas comprendidas dentro del síndrome metabólico: dislipemias, diabetes2 o alteraciones cardiovasculares tan frecuentes en la sociedad actual (1, 2).

Los factores ambientales epigenéticos, que provocan dicha programación son las hormonas y los nutrientes. Pero el estudio de la falta de nutrientes, la malnutrición en etapas perinatales (6-10) muestra que la malnutrición perinatal provoca, en etapas claves del desarrollo, disminución de hormonas genéticamente establecidas para regular el crecimiento lo que produce en los fetos malnutridos, entre otras consecuencias, una anormal programación de su axis (HPA) (2). Y, en los últimos años (11), se ha establecido (11) que el cerebro es el órgano clave en la respuesta al estrés del axis (HPA).

La existencia de la programación perinatal se produce por la plasticidad de órganos vitales en desarrollo tratando de adaptarlos a condiciones ambientales cambiantes, pero el órgano cuya plasticidad parece más evidente es el cerebro y todas las funciones vitales más relevantes y fundamentales están regidas por él. Una de las principales metas del desarrollo cerebral será, pues, producir la arquitectura neural necesaria para poder integrar la información de factores y situaciones del ambiente con sugerencias y acontecimientos que reflejen aspectos importantes del estado fisiológico del animal (12). Porque es dicha integración la que permite a un organismo elaborar conductas adaptativas, y respuestas fisiológicas, totalmente esenciales para la supervivencia de los individuos, así como, para la propagación de la especie. Pues bien, esos fines y adaptaciones los consigue el cerebro a través de las hormonas.

En esta monografía se trata de exponer los conocimientos actuales de esa interacción entre hormonas y estructuras neurales, destacando, además, la importancia clínica de dichos conocimientos. La interacción de factores ambientales, fundamentalmente hormonas, sobre el cerebro parece ser decisiva para la llamada *programación perinatal* que tiene lugar en el desarrollo de los mamíferos, por ello, en muchos capítulos, se hace un estudio dedicado especialmente a dicho período.

Comenzamos exponiendo la epigénetica del desarrollo como nueva frontera de la Neuroendocrinologia para seguir con las acciones cerebrales de las hormonas esteroides, nuevos reguladores de receptores cerebrales como las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y arrestinas, acciones cerebrales de las hormonas tiroideas, efectos cerebrales de la insulina e IGF-I, papel de la glucoquinasa como sensor cerebral de glucosa, para terminar con las acciones de la hormona de crecimiento y melatonina y con la impronta del estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas. Y, por último, dedicamos un capítulo a la caracterización y modulación de la plasticidad del cerebro humano según recientes investigaciones en curso.

2. INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroides tienen una gran similitud estructural están constituidas por las hormonas gonadales y por las secretadas en la corteza de la glándula suprarrenal. Las gonadales son fundamentalmente, el estradiol secretado por los ovarios y la testosterona por los testículos. Mientras las suprarrenales están constituidas por los glucocorticoides producidos en la zona fasciculada de la corteza suprarrenal estimulada por una hormona hipofisaria la cortotrofina o

ACTH, la aldosterona, un mineralocoicoide, que regula los electrolitos, el cual está secretado en la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal estimulada por la angiotensina II (una renina renal). También la corteza suprarrenal produce en la zona reticularis la dehidroepiandrosterona (DHA), un andrógeno, del cual aún no se conoce su hormona estimulante (2). Pues bien todos estos esteroides gonadales o corticosuprarrenales estructuralmente derivan del colesterol el cual se transforma en pregnenolona y de ahí, por un proceso de *esteroidogesis,* derivan todas las hormonas esteroides.

Son hormonas muy importantes en los mamíferos puesto que las gonadales regulan los procesos reproductivos y las hormonas corticosuprarrenales, son hormonas que regulan el equilibrio orgánico. La homeostasis del organismo que puede ser alterada por desequilibrios internos o por peligros externos como un depredador o cualquier otra amenaza externa de desequilibrio psicosocial. Otra similitud de las hormonas esteroides es que todas ejercen sus funciones uniéndose a receptores que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Estos receptores están muy extendidos en los organismos y, desde luego, están situados en diversas zonas cerebrales (2,3). Recientemente se ha mostrado, también para los dos grupos de hormonas esteroides, acciones no-genómicas uniéndose a sus receptores situados en la membrana celular.

Aunque nos vamos a centrar, especialmente, en las ultimas investigaciones sobre la regulación del axis hipotálamo —pituitaria —adrenal (HPA) a través del cerebro, expondremos algunas investigaciones que muestran la complejidad de los mecanismos del 17-estradiol para ejercer sus múltiples funciones, como soporte explicativo del dimorfismo sexual en la regulación del axis HPA.

3. HORMONAS ESTEROIDES

3.1. 17-estradiol su papel en la diferenciación sexual en período perinatal y sobre otras vertientes de conducta

No vamos a detallar la diferenciación sexual en los mamíferos producida por la testosterona secretada en los testículos fetales y desdoblada en el cerebro a 17-estradiol y dehidrotestosterona, ni cómo el estradiol proveniente de la testosterona de los testículos fetales masculiniza el hipòtálamo en cuanto a conducta sexual y en vertiente neuroendocrina. Todo ello se conoce desde los años 70 (13, 14) y además ha sido objeto de una revisión reciente (15).

Pero mucho más allá de la regulación que produce el estradiol en sus acciones esenciales en la diferenciación sexual en el hipotálamo de mamíferos (16), se ha visto actualmente que los estrógenos y andrógenos influencian la fluidez verbal, tareas espaciales, test de memoria y motores, así como la coordinación de movimientos en animales y están, además, implicados en los síntomas de depresión y en el tratamiento de ésta (17,18,19). Muchos de estos efectos difieren cualitativa y cuantitativamente entre los dos sexos, lo que sugiere que dichos efectos están sujetos a diferenciación sexual durante, pre y post natal desarrollo, es decir, a programación perinatal (16). Pero todo lo que estamos diciendo supone que la extensión de los receptores de estradiol que luego, sucintamente, describiremos, llega a regiones del cerebro fuera del hipotálamo, el cual ha sido el sitio más estudiado, debido a su papel en el control de la función reproductora. Sin embargo, hay que señalar que las acciones del estradiol sobre procesos de memoria envuelven acciones sobre estructuras cerebrales en el hipocampo y en el tronco cerebral basal, mientras los efectos sobre normal y anormal actividad motora suponen acciones de estradiol que envuelven, indudablemente, estructuras cerebrales sobre la substancia negra, así como en núcleos dopaminérgicos y en aquellos que envuelven las variaciones del humor y carácter como el sistema serotoninérgico del núcleo raphe. Y es por ello por lo que efectivamente *mapear* en cerebro los sitios donde se encuentran los receptores intracelulares de estradiol que modulan acciones genómicas, ha supuesto, los últimos años, encontrarlos, además de en hipotálamo, en regiones tales como lóbulo olfatorio, amigdala, hipocampo, corteza cerebral, locus ceruleus, raphe dorsal y cerebelo. Aunque la densidad de estos receptores es más baja y más difusa en muchos de estos sitios que en hipotálamo y en amígdala.

Se sugiere, en estos estudios, que la expresión de estos receptores está regulada durante el desarrollo y, además, que en algunas de estas regiones cerebrales su acción es transitoria (20).

3.2. Subtipos de receptores de estradiol (ERs)

Los receptores de estradiol actualmente conocidos son dos el ERα y el ERβ. Son proteinas nucleares. Ambos receptores actúan a través del mismo mecanismo. El ER, en ausencia de ligandos, reside, en principio, en el núcleo, con una pequeña proporción en el citoplasma. Los ERs actúan como un dímero que se une al ADN en secuencias diana específicas llamadas elementos de respuesta al estrógeno (EREs) las cuales están presentes en las regiones

del promotor que responde a genes (21). El receptor actúa unido a un factor de transcripción, y la unión de la hormona inicia cambios en la transcripción del gen, de lo que resultan modificaciones a nivel del mRNA del gen diana y, por tanto, de la proteína traducida. El ER, en la mayor parte de tejidos, está formado por dos monómeros con estructura idéntica. El descubrimiento en 1996 (22), y el clonaje de la forma isomorfa ERβ del receptor de estrógenos, cambió radicalmente la visión acerca de la acción de los estrógenos, y explicó porqué los ratones *knockout* para el ERα (ratones que no lo expresan) eran un organismo viable y presentaban respuesta a estrógenos, al menos, en algunos tejidos.

Actualmente, están explicados los mecanismos de acción intracelular de los estrógenos a través de ERα o ERβ receptores o, también, los posibles efectos en la superficie celular de supuestos ERs de membrana que producen bien neuroprotección o que afectan a las señales intracelulares via cAMP y MAP quinasas (23,24). El descubrimiento de ERβ ha supuesto una adicional complejidad para el entendimiento de la acción de estrógenos. Los dos ERs tienen distinta expresión en tejidos. En el útero y la pituitaria se expresa, fundamentalmente, la forma α, mientras en el cerebro e hipotálamo existen solapamientos de ambas formas α y β. La afinidad de ambas formas es distinta para los estrógenos sintéticos y para los tratamientos con antiestrógenos. En la pituitaria el ERα se expresa en niveles altos en lactotropas y en más bajos niveles en gonadotropas, y no se expresa en las células que promueven hormona de crecimiento (GH), y sólo ocasionalmente en las de corticotrofina (ACTH) o TRH(tirotropina hipotalámica), ERα esta, además, expresado más en hembras que en machos, sus niveles cambian poco por tratamiento con estrógenos contrariamente a lo que ocurre en los machos (25) Existen muchas diferencias en cuanto a la regulación de la forma α por péptidos hipotalámicos según se considere el organismo femenino o masculino (25,26).

El receptor ERβ juega un papel en determinadas células hipofisarias humanas, como las corticotropas y somatotropas, o, también, durante etapas específicas del desarrollo. La expresión del ERβ es alta en la pituitaria fetal y cambia su expresión alrededor del nacimiento en la rata siendo, sin embargo, en etapas adultas más baja que la expresión de ERα (25), La expresión del receptor β es más alta en hembras que en machos aunque pocas células expresan ERβ más que ER α en periodo adulto (25). Todo ello deberá ser recordado cuando hablemos del dimorfismo sexual que existe en la regulación del axis hipotálamo-pituitaria-adrenal. Del control hormonal del receptor β se sabe muy poco pero no parece ser regulado por estrógenos. Finalmente, diremos que el recep-

tor beta (ERβ) parece regular la expresión del alfa (ERα) y esta regulación puede ser distinta entre los géneros masculino y femenino. Actualmente se necesita ampliar el estudio de proteinas co-reguladoras y la comprensión de como ejercen su modulación sobre dichos receptores.

3.3. Mecanismos de acción de esteroides

No nos podemos entretener mucho exponiendo los complejos mecanismos por los cuales los esteroides realizan sus acciones celulares en cerebro o en otros órganos, pero si exponer que sus acciones se dividen en genómicas y no genómicas (11). Todas realizadas por los mismos receptores específicos citados y en el caso de las no-genómicas sobre membranas celulares. Las acciones se deben clasificar en genómicas o no genómicas estudiando, con rigor, los mecanismos que subyacen y no por la rapidez de su acción. Hay acciones rápidas genómicas de esteroides que afectan a la excitabilidad neural, y, por otra parte, al menos algunas de las acciones de esteroides sobre membranas envuelven uniones a proteinas G, o un efecto similar, lo que dispara un segundo mensajero y ello eleva la posibilidad de que un receptor de membrana pueda, también, regular la expresión de un gen, indirectamente, vía una segunda proteína unida al ADN que lo regule. Por otra parte, algunas importantes acciones de esteroides requieren la coparticipación de ciertos neurotrasmisores que envuelven acciones sobre células que no poseen receptores de esteroides que son los que realizan las acciones genómicas. En este caso, los efectos pueden ser trasmitidos por neuronas sensibles al esteroide. Por ejemplo la regulación por estrógenos y progesterona de las neuronas hipotalamicas que secretan GnRH-hormona gonadal- se efectúa por un sistema indirecto transináptico (11). Un sistema de regulación transináptico similar utiliza, posiblemente también, el estradiol en el hipocampo (26). Y dicho sistema lo utilizan, así mismo, los esteroides corticosuprarrenales. Esta síntesis de los mecanismos de acción de esteroides muestra la complejidad de ellos que empezamos a conocer.

Para terminar, hay que exponer que, actualmente, se están estudiando, en los mamíferos, un gran numero de dimorfismos sexuales en el cerebro, en cuanto a las acciones del estradiol a través de sus receptores, tanto morfológicas como neuroquímicas, las cuales han sido encontrados en diversas especies animales (27)(28). También se ha mostrado que el estradiol modula el funcionamiento de casi todos los sistemas de neurotrasmisores, como el sero-

toninergico, dopaminérgico, adrenérgico y colinérgico (29). Además de sus acciones sobre actividad límbica diferencial y, finalmente, tiene una gran influencia sobre el funcionamiento del axis hipotálamo —hipófisis- adrenal (HPA) (29,30).

3.4. Hormonas corticosuprarrenales

3.4.1. *Hormonas del estrés: evolución histórica. Acciones del axis HPA en el organismo*

En 1936 Tadeus Reichstein identificó la corticosterona y sus actividades farmacológicas fueron caracterizadas en el laboratorio de Ernst Laqueur en Amsterdam (1880-1947); los resultados fueron presentados a la Real Academia de Holanda (31). Esto sucedió en 1936, el mismo año que Hans Selye acuñaba el concepto de estrés (32) como "síndrome de exactamente sentirse enfermo "(*syndrome of just feeling sick)*. El cortisol fue descubierto en 1950, y Reichstein, Kendall y Hench descubrieron su gran potencial farmacológico en la artritis reumatoide, con lo cual recibieron el Premio Nobel de Fisiologia y Medicina (33). Péptidos tales como adrenocorticotrofina, vasopresina y oxitocina fueron descubiertos en los años cincuenta y sesenta, la corticotrofina hipotalámica (CRH) en 1981 y al fin la urocortina en 2001. Sus respectivos receptores han sido ya identificados y clonados. El Premio Nobel por la identificación de hormonas hipotalámicas le fue concedido a Guillemin y Schally en 1977. Pues bien, todos estos péptidos, junto con los glucocorticoides y en colaboración con el sistema nervioso autónomo, determinan e intervienen en la respuesta al estrés.

El axis hipotálamo-pituitaria adrenal (HPA), como otros muchos axis endocrinos, se configura dependiente, en primer lugar, de la hormona hipotalamica correspondiente, en este caso la corticotrofina hipotalámica CRH, que estimula en la hipófisis la correspondiente hormona hipofisaria, la corticotrofina hipofisaria (ACTH). También en hipófisis se secreta la vasopresina en el axis HPA. El ACTH estimulará la secreción de la correspondiente hormona en la corteza suprarrenal el cortisol en el hombre y la corticosterona, en lugar de cortisol, en roedores. Sin embargo, en el caso de la regulación del axis corticosuprarrenal (HPA) hay que considerar la regulación cerebral a través del hipocampo después de haber encontrado en él abundantes receptores de glucocorticoides GR y MR de mineralocorticoides (2) (Fig. 1).

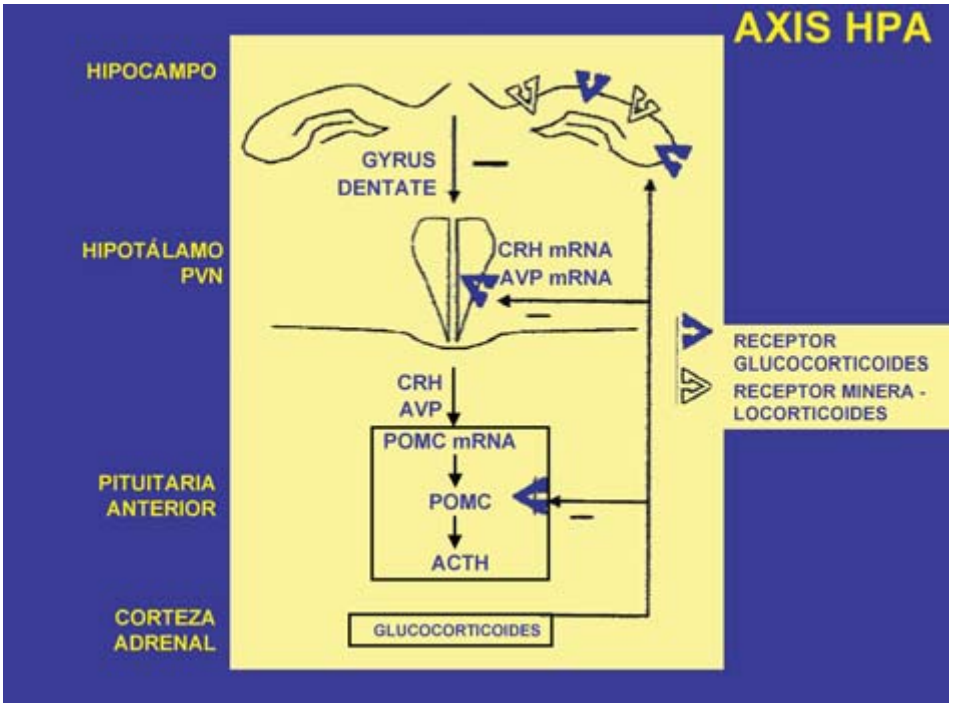


Figura 1. *El axis hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) se regula por las secreciones de la correspondiente hormona hipotalámica corticotropa (CRH) secretada en el núcleo paraventricular (PVN) junto con la arginina- vasopresina (AVP) que estimulan en pitutaria la secreción de la hormona corticotropa ACTH derivada de la proopiomelanocortina (POMC). El ACTH estimula la secreción de corticoides en la corteza suprarrenal. En la regulación de este axis es muy importante la retroalimentación negativa ejercida en hipocampo a través de los receptores específicos de mineralo y glucocorticoides MR y GR. Ver texto. Gráfica modificada de cita (67).*

Este axis, que constituye la rama hormonal fundamental para la respuesta a una situación estresante, tiene dos modos de acción. En primer lugar proporciona la secreción a plasma de cortisol a través de un ritmo circadiano de pulsos horarios, con subidas en amplitud en los periodos del día (o de la noche en roedores) de máxima actividad. Ello coordina un "reloj central" situado en el núcleo supraquiásmico del hipotálamo, con relojes periféricos del organismo y todo ello regula, además, acontecimientos y alteraciones del sueño (34). En segundo lugar, el axis HPA media la habilidad del organismo para enfrentarse con reales o imaginarios acontecimientos de peligro y que fueron llamados por Selye situaciones de estrés. Todo ello ha sido, recientemente tratado en detalle, por nosotros en 2008 (2).

3.4.2. *Causas de gestación de un nuevo concepto de los procesos del estrés*

En la centuria pasada muchos trabajos científicos han hecho descubrimientos clave en farmacología sobre las hormonas del estrés lo que ha influido, enormemente, en nuestro concepto actual sobre él. Con altas tecnologías recientes muy sofisticadas se ha estudiado el mecanismo de acción de los glucocorticoides, desde su acción sobre el gen a las modificaciones en la conducta. En concepto de hoy los glucocorticoides coordinan, en concierto con otros mediadores del estrés, las reacciones iniciales de respuesta a éste y, además, más tarde preparan la adaptación del organismo ante nuevas agresiones. Los glucocorticoides modulan el programa vital temprano de reactividad al estrés y son, también, un factor significativo para la regulación de la plasticidad neuronal cerebral que subyace en los procesos de envejecimiento. Por otra parte, dada su importancia, cada vez más se ha ido estudiando y conociendo su papel en las emociones, acciones cognitivas, e incluso se están estudiando sus posibles acciones terapéuticas en la sensibilización a determinadas drogas, como la cocaina (35). Estos estudios han llegado a cambiar el concepto de salud y enfermedad. Y, sin duda, todo ello partiendo del concepto de estrés de Selye (32).

Este investigador ya estableció que la forma crónica de enfrentamiento al estrés, que no olvidemos que él calificó como "síndrome de exactamente sentirse enfermo", producía un incremento del peso adrenal, peso decrecido del timo y, también, úlcera gástrica. Selye reconocía, que la situación crónica de estrés suprime la función inmune, y con ello se aumenta la vulnerabilidad a las infecciones. Estableció que mineralocorticoides y glucocorticoides secretados desde la corteza adrenal podían tener acciones opuestas, lo cual mostraba las acciones de ambos pro y anti-inflamatorias. La salud en la visión de Selye estaba caracterizada por un equilibrio dinámico entre actividades pro y anti-inflamatorias, y dicho concepto sigue siendo válido actualmente. Se observó que los glucocorticoides "apagan" la respuesta inicial al estrés, aunque ellos hayan sido, junto con otros, los mediadores de la respuesta. Se comenzó a pensar que el tratamiento con corticoides en clínica, está indicado si las reacciones de defensa del organismo están causando más daño a éste que los agentes mismos que han provocado el estado de defensa. En 1984 Munck (36) escribió que, en una situación de estrés, "los glucocorticoides suavizan la reacción inicial pasando más allá de la diana". Y es que las reacciones iniciales de estrés como, reacciones del sistema inmune a la infección, reacción inflamatoria en el tejido dañado, reacciones neuroquímicas a estrés psicológicos, que son cruciales para hacer frente a la agresión, se convierten en muy peligrosas para la salud si no son frenadas a tiempo, y eso es lo que los glucocorticoides pueden hacer.

Actualmente, en las sociedades humanas, el concepto de estrés se ha extendido a la llamada "adversidad psicosocial" como el más potente "estresador" de los humanos. Esta adversidad psicosocial humana puede puntualizarse en el mundo actual como falta de información ante hechos conflictivos y perturbadores de la vida, no control de ellos e imposibilidad de predecir su evolución, todo lo cual crea una sensación de miedo e incertidumbre. Por ejemplo, serios estudios documentan que el bajo estatus socio-económico produce acontecimientos en la vida diaria que gestan un estrés crónico, el cual tiene su causa en una aberrante acción de las hormonas del estrés, entre las cuales tienen un papel clave los glucocorticoides, y todo ello pronostica una mala salud (35). Estas consideraciones han llevado a replantearse los procesos de respuesta al estrés y a preguntarse, cómo estas reacciones de estrés afectan al cerebro y por tanto a la conducta. La consecuencia de ello ha sido una intensificación enorme de las investigaciones de las respuestas al estrés a nivel cerebral y a poder establecer, sin lugar a dudas, que el órgano clave de la respuesta al estrés es sin duda el cerebro (11).

3.4.3. *Receptores de glucocorticoides Concepto de allostasis y coste allostático: nuevas investigaciones sobre la regulación del axis HPA*

Los estudios realizados para establecer cómo el estrés afecta al cerebro han conducido al progreso en la comprensión de los mecanismos subyacentes iniciados por las proteinas receptoras de glucocorticoides, receptores, que al activarse por la fijación de su hormona, desencadenan y regulan en las células diana las señales de transducción a nivel de membrana y del gen. Y también se han detectado los elementos estructurales en el cerebro que muestran un alto grado de plasticidad y, a su vez, se comienzan a conocer las rutas específicas de señales cerebrales (35). Dicha modulación de los glucocorticoides en el cerebro se puede realizar gracias a la plasticidad cerebral sináptica y de las dendritas, y también se realiza por la regulación que ejercen estos glucocorticoides en ciertas regiones cerebrales sobre los procesos de apoptosis o muerte celular y su incidencia en la neurogénesis. Para todas estas acciones la llegada al cerebro de los glucocorticoides es crucial.

Los receptores de glucocorticoides son receptores nucleares, de naturaleza similar a los receptores de estradiol ERs de los que acabamos de hablar.

Las hormonas corticosuprarrenales aldosterona y glucocorticoides, ejercen sus acciones uniéndose a receptores MR (receptor de aldosterona, mineralocorticoide) y GR (receptor de glucocorticoide). Los receptores GR se ex-

presan en todos los tejidos fetales desde etapas embrionarias (37). Los receptores de glucocorticoides están extendidos en una gran variedad de tejidos: hígado, páncreas, tejido adiposo visceral, tejido esquelético y en el cerebro en regiones como el hipocampo y la amígdala, regulando la conducta cognitiva y la memoria (38) (39). Una vez activados sus receptores por la llegada de su hormona específica, utilizan para sus funciones factores de transcripción activados por ligandos. La aldosterona, y los glucocorticoides tienen acciones específicas uniéndose a sus respectivos receptores MR Y GR. Y las dos clases de receptores citoplásmicos MR y GR presentan diferente distribución en cerebro. Así los GRs están muy extendidos, especialmente en el hipocampo, los MRs son más escasos, pero de nuevo el hipocampo es la zona más rica en los mismos (40). Es curioso que los MRs presenten alta afinidad por ambos mineralocorticoides (MC) y glucocorticoides (GC), mientras que los GRs tienen una afinidad 10 veces menor por glucocorticoides; otra curiosidad es que una vez ligados al corticosteroide, ambos, MC y GC, se translocan al núcleo y se dimerizan uniéndose a la misma secuencia consenso de ADN, el llamado elemento de respuesta al receptor de glucocorticoide (GRE). Sin embargo, muchas evidencias muestran que cada receptor tiene su propio espectro de acciones tanto en la misma célula como en distintos tejidos, incluso en diferentes áreas del cerebro. La presencia de un único GRE para ambos receptores, GR y MR, dificulta la comprensión de sus diferentes acciones fisiológicas. Parece que la zona N -terminal de estos receptores, es la menos homóloga entre ambos, y puede moderar distintas interacciones entre receptores y cofactores para activar o reprimir genes en su posterior expresión (41) Todo ésto resume las acciones de los receptores y sus complejos modos de acción que fueron recientemente tratados (2).

Pero actualmente se han hecho descubrimientos que aclaran determinadas lagunas que existían acerca de cómo actúan estos receptores MR y GR en momentos de estrés y sus relaciones recíprocas en situaciones de alarma. Estas investigaciones explican la actuación de ambos ante el estrés en el sistema límbico cerebral - hipocampo - en el cual ampliamente se expresan, y ello ha ayudado a completar y ampliar el conocimiento de las pautas de regulación del axis hipotálamo - pituitaria - adrenal (HPA) anteriormente expuestas en figura 1. Realmente en las pasadas décadas el equilibro de señales entre MR/GR ha sido muy estudiado.

En la regulación del axis HPA, el papel de los receptores de GR es bien comprendido, ya que provocan una retroalimentación negativa que bloquea en hipotálamo la secreción de su hormona CRH y bajan, como consecuencia fi-

nal, los niveles circulantes de corticoides (Fig 1). En esta regulación el número de receptores de GR en hipocampo modula enormemente la funcionalidad del axis. Si los GR disminuyen en dicho órgano, el bloqueo del funcionamiento de HPA se realiza muy mal y, entonces, es un axis que funciona desmedidamente, lo que produce niveles altos de glucocorticoides circulantes, como sucede en el estrés crónico. Contrariamente, el aumento de los GR hipocampales supone un axis bien regulado con niveles adecuados en plasma de glucocorticoides (Fig. 1) (2).

Actualmente, se piensa que los glucocorticoides son cruciales para ambas respuestas, la inicial del estrés y la final (Fig. 2). Y parece que el papel de los receptores GR se ejerce en la última fase de respuesta, dando como resultado la recuperación desde la situación de estrés inicial a un estado normal del organismo. En esta última fase se produce almacenaje en la memoria de lo sucedido lo que permite preparar el organismo a nuevas situaciones de emergencia similares. Además, se movilizan recursos energéticos, y en general todo ello se dirige a preparar futuros acontecimientos, restituyendo así, además, la homeostasis alterada previamente en la fase inicial por la salida de glucocortiocoides.

Pero en 2005 Karst y Marian Jöels (42) establecieron lo que se ha llamado la hipótesis MR/GR. Demostraron que los mismos MR nucleares, que regulan transcripción de genes, residen también en las membranas de las neuronas de la región CA1 del hipocampo en donde los MR, fijando los glucocorticoides, realizan acciones rápidas no-genómicas. La actuación de MR por la llegada de glucocorticoides promueve pequeñas corrientes excitatorias, corrientes postsinápticas (mEPSC), las cuales reflejan la posibilidad de secreción de glutamato. Los últimos trabajos de este grupo muestran que estos receptores MR de membrana aumentan rapidamente la trasmisión pre y post sinaptica y la transmisión excitatoria. Lo que concluyen es que la activación de estos receptores menbranares MR en el hipocampo, por la llegada de glucocorticoides, amplifica la transmisión cerebral de los procesos que subyacen en situaciones de alerta: atención, vigilancia y valoración de la situación. Estas investigaciones completan los conocimientos de cómo los glucocorticoides regulan el axis HPA en momentos de estrés (Fig. 2). En la fase inicial, el aumento de glucocorticoides en el sistema límbico, hipocampo, causa rapidamente acciones no genómicas a través de receptores menbranares de MR que movilizan CRH y el sistema simpático, el cual, a su vez, es modulado por vasopresina y oxitocina, y así, de esa forma aumenta la alerta, se activa la conducta y los procesos cognitivos para valorar la situación. Todo ello sucede en el contexto de un estado de estrés. Fuera de ese contexto esos “estresadores” (CRH o el sistema simpá-

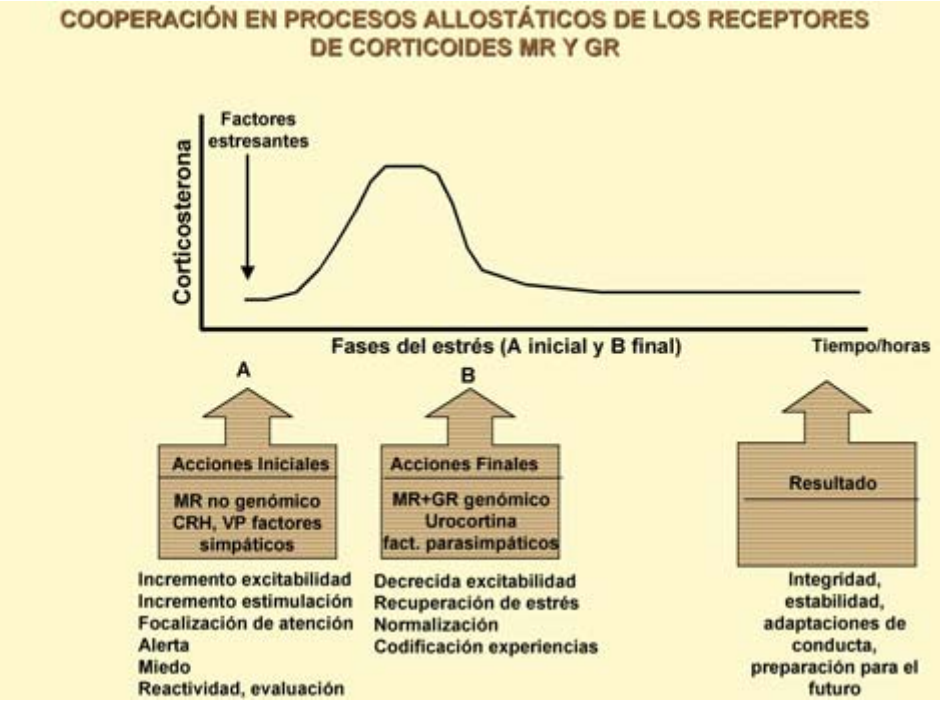


FIGURA 2. *La llegada de un factor estresante dispara el axis HPA que conducirá a la subida en plasma de corticosterona en la rata y en esta fase A, fase inicial, la llegada al sistema límbico concretamente al hipocampo de altos niveles de corticosterona amplifica la acción de mediadores iniciales de ella como el CRH y la actividad simpática, que son modulados por la vasopresina y que subyacentemente engrandecen la alerta, la atención y la valoración de la situación. Todo ello a través de la activación de receptores de membrana MR y por acción no —genómica producen corrientes que aumentan la excitabilidad hipocampal. En la fase final B tasas más bajas de glucocorticoides dirigen la recuperación de la situación de estrés a través de acciones genómicas de ambos receptores MR y GR que decrecen la excitabilidad y, además, almacenan la memoria de la experiencia sufrida. El resultado final es la restitución de la integridad del organismo, estabilidad, adaptaciones y preparación para futuras experiencias. Ver texto. Gráfica modificada de ref (35).*

tico) interfieren los procesos de información, es decir, los procesos cognitivos. En una segunda fase, y a través de receptores MR y GR, los glucocorticoides producen el bloqueo del axis y, por consiguientemente, la recuperación de la situación de estrés (Fig. 2). Como la afinidad de este receptor de membrana MR por la corticosterona es diez veces más baja que cuando este receptor esta haciendo acciones genómicas, puede actuar de forma no genómica solamente cuando los niveles de glucocorticoides son altos, es decir, en la fase inicial del estado de estrés (Fig. 2).

En su trabajo del 2008 (43) publicado en Frontiers in Neuroendocrinology, estos autores se preguntan muchas cosas, entre ellas, si estos receptores de membrana MR son exactamente iguales a los que producen, una vez activados, acciones genómicas, y las perspectivas e ideas que anuncian para futuros estudios pueden ser muy interesantes para desentrañar esta intrincada regulación del axis HPA.

Lo que es cierto es que estas investigaciones establecen la importancia del equilibrio MR/GR, las dos clases de receptores corticosuprarrenales, para la regulación del axis HPA y su papel en los procesos cerebrales concernientes a las conductas de aprendizaje y memoria. Esta cooperación de ambos receptores ha mostrado que los glucocorticoides, actuando vía MR y GR, cambian la excitabilidad de las células y circuitos neuronales que regulan los procesos de emoción y cognitivos que van unidos a nuevas situaciones vividas, y a nueva información. Las respuestas de conducta a las situaciones nuevas dependen del tipo de receptor envuelto y de la fase que se considere, y también de la clase de información que proporciona la experiencia nueva. Los estudios en rata han mostrado que la activación de los receptores GR promueve el almacenamiento y la consolidación de nueva información, mientras la activación cerebral de MR no parece mediar los efectos de glucocorticoides referentes al almacenaje de información, sino, preferentemente, media procesos de valoración y de elección de una apropiada conducta para cada situación. Es muy reciente el conocimiento de que estos efectos realizados por MR y GR ejercen sus acciones utilizando concertadamente rutas genómicas y no genómicas (44) (45) .Resumiendo, las nuevas investigaciones sobre los mecanismos de regulación del estrés establecen, pues, un equilibrio de acción entre ambos receptores MR/GR, y concluyen que una sola hormona actuante, el cortisol en humano o la corticosterona en la rata, el glucocorticoide, es la que actúa; a través de un sistema de señales dual con complementariedad y parcial solapamiento, (Fig. 2). Ello se contrapone a la hipótesis de Selye (32) que parecía proponer efectos opuestos de mineralocorticoides y glucocorticoides.

No obstante, cuando se estableció la hipótesis de la respuesta al estrés produciendo una cascada de glucocorticoides de salida a plasma, hecha por Sapolsky y Mc.Ewen (46), ya se observó que en el estrés crónico la respuesta de salida de glucocorticoides a plasma persiste, y esos niveles altos regulan a la baja la expresión de los receptores GR en hipocampo y no se produce bien la retroalimentación negativa, y así el axis no se bloquea y los glucocorticoides circulantes continúaran cronicamente altos. Pero hoy se ha visto que dichos su-

cesos tienen como consecuencia el descenso de los recursos energéticos del organismo por la acción catabólica de los glucocorticoides y el aumento del estrés oxidativo, además de producirse la supresión de las respuestas inmunes, con todo lo cual se perturba la adaptación al estrés. Porque entonces, inexorablemente e inevitablemente, aumenta la vulnerabilidad a nuevos desequilibrios que puedan producirse, y el organismo es entonces muy vulnerable a patologías.

Todo ello porque durante la reacción de alarma general o estrés, y mientras el estado de emergencia subsiste, numerosos sistemas biológicos, además del neuroendocrino, son activados y eso incluye la movilización de energia (ácidos grasos libres, glucosa, glicerol y aminoácidos) desde almacenes de nutrientes (triglicéridos, glucógeno y proteinas) y se produce también un bloqueo del almacenaje de energia, con un incremento en el pulso del tono cardiovascular/pulmonar para facilitar la salida de oxígeno y glucosa y, por tanto, hay, como consecuencia, un descenso de los procesos anabólicos. Suprimiéndose, además, los procesos de digestión, crecimiento, reproducción y de respuestas inflamatorias e inmunes. Simultáneamente a estas adaptaciones metabólicas y neuroendocrinas, hoy sabemos que los procesos cognitivos están alterados y los umbrales sensoriales bajos. Todas estas adaptaciones son lógicas para hacer frente a una situación de emergencia, a un desequilibrio interno o externo del organismo, pero se piensa que todo ello parece producirse en la fase inicial del estrés. Y es en una segunda fase de adaptación al estrés, en la concepción actual de estos procesos, cuando los mecanismos de retroalimentación negativa en el axis HPA son activados para contrarrestar el desequilibrio interno del organismo. Todo ello, pone de manifiesto la importancia de la regulación del sistema hipotálamo-pitutaria - adrenal (HPA) que se produce a través del cerebro.

La respuesta al estrés es ahora concebida y llamada *"allostasis*" que literalmente significa "mantenimiento de la estabilidad a través del cambio" (*maintaining stability through change)*. Dicha concepción y el nombre de allostasis fueron acuñados por Sterling en 1988 (47).

Fácilmente se comprende que esta respuesta adaptativa del organismo a una situación de emergencia debe ser transitoria y bloqueada con rapidez por la retroalimentación negativa, de la que hemos hablado, para a través del cerebro recuperar la homeostasis orgánica. Pero si el estado de adaptación al estrés inicial se prolonga, nos situaríamos en un estado de estrés crónico. Y entonces la supresión de procesos anabólicos, la disminución de almacenes de energia y el bloqueo del sistema inmune pueden ser devastadores para el organismo. Estas reflexiones han llevado al convencimiento de que prolongadas e incontroladas fuentes de estrés conducen al organismo a la pérdida de su resistencia y a en-

trar en una fase de agotamiento (46). Todo ello es lo que ha establecido la concepción de ”coste allostático” (*allotatic load*) que se refiere al precio a pagar en un tejido u órgano por una ineficaz respuesta allostática, es decir, se refiere al coste de adaptación a una situación de estrés (11). En palabras de McEwen (11) allostasis significa el proceso para mantener la estabilidad - homeostasis - por medios activos, exactamente utilizando las hormonas del estrés y otros mediadores de él, y coste allostático es el desgaste y desgarro causado sobre el cuerpo y el cerebro por el uso de la allostasis, particularmente, cuando los mediadores no son regulados, es decir, no cesados, cuando el estrés termina, o secretados inadecuadamente para actuar en momentos de emergencia cuando son necesarios.

Los mediadores fundamentales de las adaptaciones frente a una situación de emergencia, que llamamos estrés, son, fundamentalmente, el axis HPA y el sistema autónomo.

En el mundo animal, se ha resumido en “lucha o vuela” la respuesta ante una situación de peligro; sea un depredador, un accidente o un desastre natural, queriendo sintetizar en esta expresión las respuestas de conducta y las fisiológicas. Pero los humanos son más propensos a periodos de actividad elevada de estos sistemas, lo cual, sin duda, nos ayuda a sobrevivir en situaciones de cambios muy acusados. En los seres humanos la prolongada elevación de esos sistemas, mediadores del estrés, puede ser debida a ansiedad, a constante exposición a ruidos, polución, conflictos interpersonales o cambios en el estilo de vida, y, también, a conductas no saludables, las cuales terminan por establecer un estado crónico de estrés. Han sido las reflexiones actuales sobre estas cuestiones las que han llevado al conocimiento de la importancia de los efectos de protección, así como, de los posibles daños potenciales que pueden producir los mediadores del estrés. Estas reflexiones han conducido a la reconsideración de los procesos de adaptación al estrés, lo cual ha llevado a la necesidad del estudio de estas cuestiones a nivel cerebral.

En la tabla 1 se resume el multidimensional concepto de adaptación al estrés que se ha establecido en la actualidad. En él se destacan tres importantes cuestiones centrales: el estímulo que provoca la situación de emergencia, la evaluación cognitiva de su existencia por el organismo, y las respuestas fisiológicas que resultan. Todo ello, provoca la activación de respuestas biológicas a través del cerebro, que elaboran modulaciones neuroendocrinas conectadas con conductas y, como consecuencia, conjuntamente la plasticidad cerebral interactuando con los procesos allostáticos conducirán, finalmente, a restaurar el equilibrio del organismo. Sin embargo, no necesariamente se restaurará el mismo

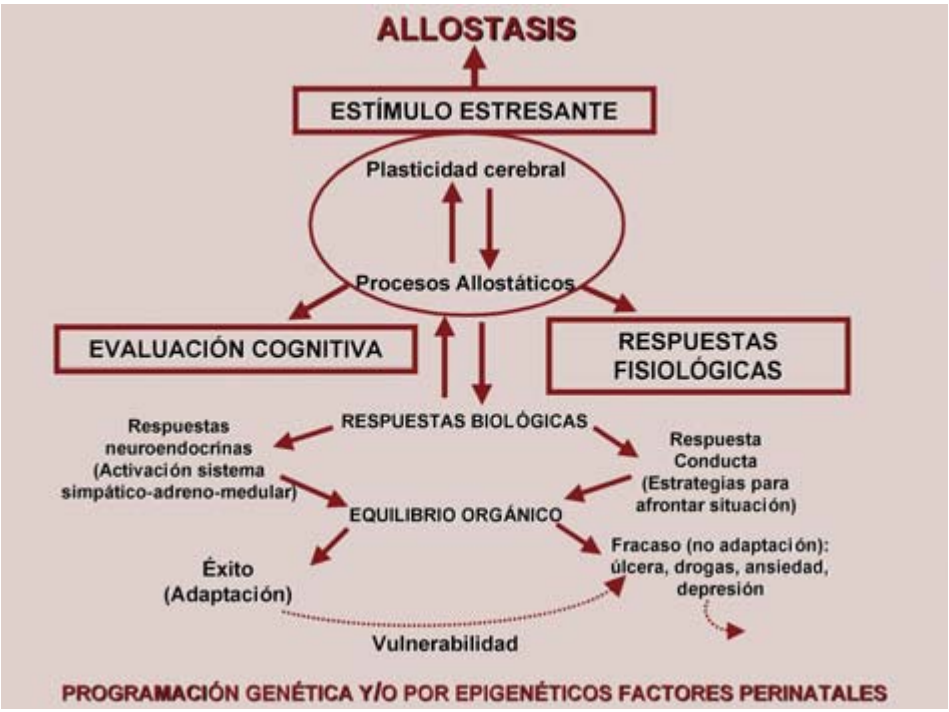


TABLA 1. *Allostasis es conceptualmente el conjunto de procesos que tienden a restaurar el equilibrio orgánico después de un estado de estrés y se establece en torno a tres cuestiones: un estimulo estresante, una evaluación cognitiva de lo que sucede y una respuesta fisiológica. Todo ello teniendo como papel central la plasticidad cerebral en primer lugar actuando a través de procesos allostáticos que a su vez modulan la plasticidad del cerebro y que elaboran respuestas biológicas en dos vertientes neuroendocrinas (activación del sistema simpático adreno —medular) y respuestas de conducta (estrategias para afrontar la situación) y ambas tienden a restablecer el equilibrio orgánico . Finalmente, se consigue bien éxito (adaptación del organismo) o fracaso (inadaptación) y cuando más cerca estemos de esto último más vulnerabilidad para el organismo. La capacidad de allostasis de cada organismo esta programada geneticamente y/o por factores epigenéticos perinatales.*

equilibrio que se tenía antes de la situación de estrés. Estas respuestas neuroendocrinas y de conducta pueden conducir al éxito o adaptación a la situación de emergencia o al fracaso o inadaptación, en dicho caso la vulnerabilidad del organismo aumenta y la posibilidad de úlceras uso de drogas, ansiedad y depresión serán consecuencia de dicho fracaso (Tabla 1).

Además, cuando las causas del estrés se prolongan y/o no son controlables, la retroalimentación negativa no puede restaurar el equilibrio orgánico, la respuesta al estrés se convierte en inadecuada y puede, por último, llegar a produ-

cir estados patológicos que incluyen desórdenes del sueño y del carácter. Esta incapacidad en restaurar el equilibrio orgánico aumenta la vulnerabilidad a enfermedades. Estas concepciones son ahora tan evidentes que están sometiendo a reconsideración el concepto de salud y enfermedad.

Esta adaptación al estrés que llamamos allostasis está regida por una programación realizada por factores genéticos y epigéneticos, ambientales, la cual se produce, de forma decisiva, en periodos de inmadurez (Tabla 1).

3.4.4. *Papel central del cerebro: mecanismos que regulan la entrada de glucocorticoides al cerebro. Hipocampo*

El cerebro es el órgano del cuerpo que, para proteger la integridad del organismo, interpreta determinadas experiencias y las distingue como amenaza a él o como no amenaza y, luego elabora las respuestas fisiológicas y la conducta para cada situación. Además del hipotálamo y el tronco cerebral, los cuales son esenciales para las respuestas del sistema nervioso autónomo y neuroendocrino a los agentes estresantes, áreas más altas del cerebro juegan un papel clave en los procesos de memoria, ansiedad y decisiones a tomar. Todas estas áreas cerebrales son diana del estrés y de las hormonas que él moviliza (11). Además los efectos agudos y crónicos derivados del estado de estrés dependen de cómo estas áreas cerebrales responden a él. El cerebro es el órgano clave de la respuesta al estrés porque controla también las posibles conductas y respuestas fisiológicas a potenciales experiencias futuras de estrés (Fig. 3).

Los factores estresantes de cualquier tipo inciden sobre el cerebro y el los clasifica como amenazas o no y predispone a una situación de vigilancia o de impotencia La respuesta cerebral tanto de conducta (dieta, fumar o ejercicio físico) como fisiológica depende, en cada organismo, de sus genes y de su programación y experiencias de ese organismo durante su periodo perinatal que condicionan, junto con su conducta, la respuesta fisiológica. Esta repuesta fisiológica tendrá un coste allostático y por último la allostasis conducirá a la adaptación (Fig. 3).

Todo ello es particularmente evidente cuando se consideran estas cuestiones en las distintas etapas de la vida, en etapas tempranas, durante el desarrollo, las experiencias sufridas combinadas con factores genéticos, ejercen una influencia importante sobre la respuesta al estrés adulta (2,3) y repercuten en el envejecimiento (2,3)(48).

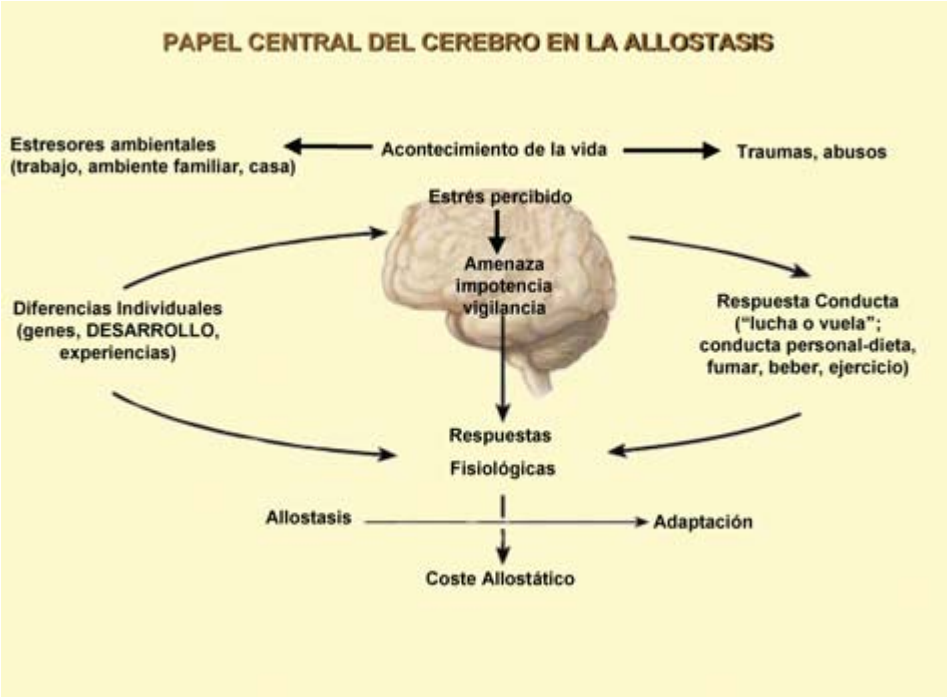


FIGURA 3. *El cerebro ocupa un lugar central en la allostasis El cerebro percibe todos los acontecimientos estresantes durante la vida según las diferencias individuales genéticas y las experiencias durante su desarrollo. Las percibe y las traduce en amenazas, impotencia o vigilancia y elabora las respuestas fisiológicas moduladas por las características individuales y, también la conducta para enfrentarse a la situación de emergencia. Estas conductas, a su vez, modulan las respuestas fisiológicas que produciendo un coste allostático, más o menos grande, conseguirán la adaptación del organismo por allostasis. Gráfica modificada de cita (11).*

Hay que decir que estamos hablando del estrés y sus posibles consecuencias en la vulnerabilidad a patologías pero estudios sobre animales y estudios epidemiológicos en humano (49) están dando cada vez más crédito a la "hipótesis del desgaste" (*weathering hipótesis*) elaborada en 1992, estudiando mujeres africano-americanas y sus niños (50). Estos estudios muestran que el envejecimiento se acelera por experiencias abundantes de estrés durante la vida.

Los estudios serios de estas cuestiones a nivel cerebral comenzaron cuando al final de los años sesenta encontraron, el grupo de Mc Ewen (51) (52), receptores de los corticoides en el hipocampo en formación. Y esta región del cerebro, que forma parte del sistema límbico, es importante para la formación de la memoria espacial y episódica dentro del contexto de un suceso (2) (53, 54).

El hipocampo, junto con el núcleo paraventricular del hipotálamo y la amigdala, son las áreas cerebrales, y también el cortex prefrontal, donde se expresan, abundantemente, los receptores de corticoides; tanto los receptores de glucocorticoides (GR) como los de mineralocorticoides (MR). Estos receptores, como hemos mencionado, juegan un papel importante en el hipocampo regulando el axis (HPA), así como tienen una acción neurogénica en esta área cerebral (2). Pero hay que señalar, también, que el área hipocampal, con sus altas concentraciones de GR y MR, es particularmente sensible a los efectos potencialmente perjudiciales de los corticosteroides. Estos receptores están situados en el hipocampo, fundamentalmente, en tres regiones llamadas CA1, CA2 y CA3 y también en la zona hipocampal llamada *gyrus dentate* (2).

Las acciones más sorprendentes de los corticosteroides ocurren en el *gyrus dentate* que, junto con el área paraventricular, son las únicas regiones del cerebro adulto donde se ha confirmado, hasta ahora, la aparición de nuevas neuronas en las especies de mamíferos estudiadas (55, 56). A pesar de los esfuerzos para demostrar la necesidad de la neurogénesis para determinadas formas de aprendizaje que dependen del hipocampo (57,58) este fenómeno todavía está sujeto a debate (2). El hipocampo ha sido el área más estudiada del cerebro, en esta vertiente, y además es una parte cerebral que presenta una gran plasticidad.

Pero antes de seguir vamos a exponer los mecanismos que regulan la entrada cerebral de glucocorticoides y también que tanto los mecanismos de entrada al cerebro como el metabolismo de los glucocorticoides, en el tejido cerebral, juegan un gran papel para determinar la magnitud de los efectos de estas hormonas en el hipocampo y, en general, en todas las áreas cerebrales que tienen receptores.

Existen tres mecanismos que regulan la entrada de los glucocorticoides al cerebro. Uno es la globulina que une en plasma a los corticoides, la CBG (*corticoid- binding globulin*) que determina el nivel de corticosterona libre en plasma de ratas, o cortisol libre en plasma humano, y que, por tanto, pueden ganar acceso al cerebro, ya que sólo los corticoides libres podrán uniserse en el cerebro al receptor específico (2). Si los niveles de GCs se incrementan mucho, como en situaciones de estrés o patologías como el síndrome de Cushing, que cursa con níveles muy altos de corticoides, la capacidad de transporte de la CBG se ve saturada y los niveles de corticosteroides en cerebro se incrementan desproporcionadamente.

Otra barrera de entrada de los glucocorticoides(GC) al cerebro se produce porque aunque los esteroides son moléculas altamente liposolubles, la barrera

hematoencefálica contiene transportadores de glicoproteína P de resistencia a multidrogas (mdr-1a) que, al menos en roedores, exportan compuestos exógenos fuera del área cerebral como el cortisol y el glucocorticoide sintético dexametasona, no así la corticosterona, que no es reconocida como sustrato por el transportador. Sin embargo, si se administran cortisol y dexametasona a ratones que no expresan mdr-1a (ratones *knockou*t) ambos corticosteroides quedan retenidos y se acumulan en las zonas del hipocampo en los receptores MR y GR (59). Todo ello supone ya un control en sangre para la acción de los corticoides en distintos órganos. Sin embargo, en los pasados 20 años se ha establecido la gran importancia para el control de la actividad biológica de los glucocorticoides de dos isoenzimas que tienen un papel clave modulando la acción fisiológica y funciones patológicas de los glucocorticoides (GCs), y que constituyen el tercer mecanismo de control.

La 11β-hidroxiesteroide-deshidrogenada 1 (11β HSD 1) es una 11β- reductasa que cataliza la conversión de cortisona inerte a activo cortisol por transformar el 11-ceto en grupo hidroxílico 11-OH, o bien la 11- dehidrocorticosterona en corticosterona haciendo lo mismo en el carbono 11. Es decir, convirtiendo corticoides inertes en activos y apropiados para unirse a su receptor específico. Pero, posteriormente, se clonó desde el riñón y la placenta la 11β -hidroxiesteroide dehidrogenasa 2 (11β.HSD 2) que es una deshidrogenada que efectúa la reacción en sentido contrario, trasformando glucocorticoides activos en inertes (2).

La isoenzima 2 funciona como una barrera intracelular, eliminando glucocorticoides biológicamente activos. Por ejemplo, en el riñón permite que la aldosterona se fije a su receptor específico MR sin competir con el glucocorticoide que tiene una afinidad más alta para los receptores MR, ya que previamente los inactiva por su presencia en el riñón, y ello ocurre, también, en otras situaciones fisiológicas y otros órganos (60,61).

Aunque en el cerebro hay un poco de corticoides que provienen del colesterol, los neuroesteroides, la mayor cantidad de corticoides llega desde la sangre. Por ello es importante el papel desempeñado por la globulina transportadora (CBG). Pero, no obstante, una vez dentro del cerebro, los corticosteroides encuentran la actividad de la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenada 1 (11BHSD). Los resultados obtenidos con ratones que no la expresan demuestran que la producción local del corticosteroide activo por dicha enzima, es un factor determinante de la sensibilidad cerebral a los corticosteroides y de la regulación del axis HPA (62). Estos resultados también sugieren que una actividad de la enzima 11βHSD tipo 1 podría ser beneficiosa para el cerebro en determinadas circuns-

tancias, por ejemplo, inhibidores de esta enzima que rebajan la actividad biológica (63), en el caso humano del cortisol, mejoran la función cognitiva en ancianos y pacientes de diabetes tipo 2, los cuales presentan niveles altos de glucocorticoides.

La 11BHSD dependiente de NAD o tipo 2, como tiene la actividad opuesta a la 1, asegura que los corticosteroides que entran en las células que la expresan sean inactivados antes de unirse a sus receptores. Se encuentra, en periodo adulto, en altas cantidades en células epiteliales de riñón, cólon y glándulas salivares, y poco en cerebro. Su inactivación, por ello, en las células epiteliales del riñón, capacita a los glucocorticoide (GCs) para actuar como mineralocorticoides (MC) (64) En cerebro adulto, esta enzima apenas se expresa, aunque se encuentra en algunos núcleos y puede controlar los efectos selectivos, a nivel central, de la aldosterona sobre el balance de sal y la presión sanguínea (61). Sin embargo, durante el desarrollo, la elevada expresión de esta enzima en la placenta y cerebro prenatal protege, como expondremos, al organismo inmaduro de los altos niveles de GCs típicos de la gestación (65)). Un exceso de glucocorticoides (GCs) durante el desarrollo tiene efectos adversos, como malformación del cerebelo (65), incremento de la actividad del eje HPA durante la vida adulta (66) y un incremento de enfermedades relacionadas con alta sensibilidad a los corticosteroides (39)

3.4.5. *Hormonas metabólicas que afectan al hipocampo. Mecanismos de la allostasis*

El aumento hipocampal de receptores de corticoides establecido en la programación perinatal del axis, conduce, en periodo adulto a un axis controlado y equilibrado, en cuanto a la salida de glucocorticoides en los estados de alarma, frena el axis HPA en la fase posterior del estado allostático evitando, en un axis HPA bien regulado, los daños al organismo de una situación de estrés crónico (67).

Pero también se ha dicho que en un estado de alarma, por la acción catabólica de los glucocorticoides, se mobilizan recursos energéticos como ácidos grasos libres, glicerol, glucosa y aminoácidos y disminuyen las reservas energéticas, todo lo cual retarda los procesos anabólicos. Estos procesos se producen unidos a la depresión del sistema inmune y a una disminución en los procesos cognitivos debido al descenso de los umbrales sensoriales. Este conjunto de adaptaciones es lo que permite la supervivencia del organismo. Y todo ello está regido a nivel cerebral.

Pues bien, la primera pregunta es cómo se realiza o también ¿dónde están los receptores de hormonas metabólicas cerebrales para que dichas adaptaciones tengan lugar? Hoy sabemos que conjuntamente con los glucocorticoides y aminoacidos excitatorios ciertas hormonas proteicas metabólicas tienen efectos en el hipocampo porque existen sus receptores en él.

El hipocampo tiene receptores para el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1, *insulin-like growth factor 1*) (68) y también para la insulina (68), los cuales responden a insulina circulante traslocando los transportadores de glucosa en las membranas celulares (69). El IGF-1 es un mediador clave para la facilidad que tiene el ejercicio físico en aumentar la neurogénesis en el *gyrus dentate* en periodo de desarrollo hipocampal. La hormona de crecimiento (GH) se expresa en hipocampo donde es regulada por un estrés acusado o por el estradiol en las hembras (70). Aunque es expresada en hipocampo, la GH también entra al hipocampo desde la circulación por un sistema de transporte no específico. La ghrelina, una hormona que regula el apetito aumentándolo, se ha mostrado que estimula la formación de sinapsis en las neuronas piramidales del hipocampo y, como consecuencia, mejora la memoria que depende de ellas (71). Es transportada al cerebro según un sistema saturable y los receptores de ghrelina se encuentran en el hipocampo y también en otros lugares del cerebro (11).

Otra hormona metabólica, la leptina, ha sido encontrada en cerebro, aunque no expresada en él. Ambos, glucosa e insulina, median la habilidad del ayuno para transportar la leptina al cerebro (72) Y se ha visto que dicho péptido tiene efectos antidepresivos y que aumenta algunos aspectos de los procesos cognitivos (11).

Hay poca información de los mecanismos moleculares y celulares por los que estas hormonas producen sus efectos, y tampoco si ellas interactúan con otros factores en conexión con mecanismos que modulan la plasticidad del hipocampo. Una dieta alta en grasa y la exposición a un depredador retrae las dendritas de la zona CA3 del hipocampo cosa que no hacen ninguna de ambas situaciones aisladamente (73).

Estamos, pues, al comienzo de comprender como actúan estas hormonas en el hipocampo. Estas hormonas regulan el balance energético en el cerebro, la leptina y la insulina, como anorexigénicos cerrando el apetito (74), dando cuenta al cerebro de la masa grasa global la primera, y de la grasa visceral la segunda (74); la ghrelina como orexigénico, abre el apetito.

No sabemos los mecanismos por los que regulan la estructura y la neurogénesis hipocampal. Lo que si conocemos es que estos péptidos, que regulan el balance energético a través del cerebro, utilizan sus conexiones con el sistema simpático, e interactúan con todo tipo de neutransmisores. Neurotransmisores clásicos, como la noradrenalina y la adrenalina y otros, no adrenérgicos, como el γ-aminobutírico GABA o la acetilcolina o el glutamato, exactamente igual a como actúan en el cerebro los receptores activados de glucocorticoides.

Si consideramos las dos vertientes de la respuesta al estrés que desencadenan los glucocorticoides; por una parte, en la fase inicial, de protección y, por otra, de posible daño si en la última fase continúan demasiado tiempo altos. En estas dos situaciones fisiológicas enfrentadas los glucocorticoides actúan a través de determinados "mediadores" que podemos llamar elementos estresantes. Entre éstos, al lado de las catecolaminas, norepinefrina y adrenalina o epinefrina, hay, pues, muchos más mediadores que participan en el proceso allostático y, todos están unidos en una red de regulaciones no-lineal, lo que significa que cada mediador tiene la habilidad para regular la actividad de otros y, algunas veces, de una manera bifásica.

Citoquinas pro y antiinflamatorias son producidas por muchas células en el cuerpo y todas ellas se regulan unas a otras conjuntamente a ser moduladas por los glucocorticoides y catecolaminas, y a su vez las catecolaminas pueden incrementar la producción de citoquinas proinflamatorias (75). Pero se conoce que los glucocorticoides inhiben dicha producción (76). Paralelamente, el sistema parasimpático, oponiéndose al simpático, también contribuye a esta no-linealidad que presenta la allostasis. Lo que significa que este proceso no linear de allostasis se produce cuando un mediador es aumentado o decrecido, ya que entonces existen cambios compensadores en otros mediadores que son dependientes del tiempo y del nivel de cambio de cada uno de ellos (11).

3.4.6. *Coste allostático: alteraciones del sueño en procesos allostáticos*

El término "coste allostático" quiere significar el desgaste o desmejoramiento que resulta de excesivo estrés, o de una acción ineficiente en la allostasis; como es el no interrumpir la respuesta cuando no es necesaria, o bien, mantenerla demasiado tiempo.

La experiencia de estar "completamente estresado" tiene como consecuencia esencial la elevación de algunos sistemas claves que conducen a coste allostático. Estos sistemas son, fundamentalmente, cortisol en plasma producido por activación del axis HPA, actividad simpática y secreción de citoquinas pro-inflamatorias con un declive en la actividad parasimpática. Estas posibles alteraciones en ninguna situación están mejor contempladas que en el estado que comporta un pobre o inadecuado sueño, el cual, frecuentemente, es un resultado que se establece en un estado de máximo estrés. La privación de sueño provoca un coste añadido que puede tener consecuencias muy graves.

El cerebro es el rector que regula los sistemas neuroendocrinos, el sistema autónomo e inmune así como la conducta (77) (Fig. 3). Por ello, alteraciones en las funciones cerebrales por estrés crónico pueden tener efectos, directos o indirectos, sobre un acumulativo coste allostático. Restringir el sueño a 4 h. por noche, en humano, incrementa la presión sanguínea, decrece el tono parasimpático, incrementa los niveles de cortisol y de insulina, aumenta el apetito; posiblemente por aumento de la ghrelina y decrecimiento de los niveles de leptina (78). Tan sólo con una restricción de sueño de 6h se produce, en los animales, además de aumento en citoquinas pro-inflamatorias, una acción decrecida en los test psicomotores de vigilancia y, utilizando diferentes test, se muestran daños en los procesos cognitivos, con decrecida proliferación de células en el *gyrus dentate* del hipocampo y de la región CA1 (79)(80).

Verdaderamente, hay actualmente una gran cantidad de trabajos sobre animales que muestran que la privación de sueño perturba la memoria y las acciones cognitivas. También hay evidencia de que la restricción del sueño no solamente altera los procesos cognitivos sino también los niveles neurales de citoquinas, de los marcadores del estrés oxidativo y de los niveles del glucógeno cerebral. Todas estas alteraciones se suman para el deterioro de los procesos de conocimiento. Además, en animales, la privación de sueño conduce a conductas de lucha y agresión (11).

El cerebro es la diana del estrés y de sus hormonas. Los procesos de allostasis y el coste allostático están dando ejemplos de cómo las diferentes regiones del cerebro responden a "estresadores" agudos y crónicos. El hipocampo fue el primer lugar cerebral que se reconoció como diana de las hormonas del estrés y ha sido el más estudiado, sobre su estudio se asienta el conocimiento de cómo el estrés impacta en la estructura cerebral y en la conducta. Con mucha menos intensidad se conocen los efectos del estrés sobre la amígdala y el cortex prefrontal.

3.4.7. *Acciones del estrés sobre el hipocampo, amígdala y cortex prefrontal*

No insistiremos en las acciones genómicas y no genómicas de los glucocorticoides en situación de estrés a través del hipocampo en los procesos allostáticos, ni en la nueva hipótesis de equilibrio entre receptores de MR/GR en esta área, realizando acciones genómicas y no genómicas, porque han sido previamente expuestos, ni como ellos resaltan el papel del hipocampo en la regulación del axis HPA. Solamente vamos a exponer los efectos del estrés sobre el aprendizaje y memoria, y algo sobre los cambios estructurales que las hormonas del estrés son capaces de realizar sobre el hipocampo, amigdala y cortex prefrontal.

3.4.7.1. Hipocampo

Como expusimos previamente (2) la administración de GCs en el hipocampo estimula la consolidación de memoria tras un entrenamiento, particularmente en tareas con un componente textual o espacial. Adrenalectomía o un exceso de corticosteroides anula el comportamiento de evasión previamente aprendido en ratas, por ejemplo, ante una maza que las golpea, un déficit que se subsana con la administración de dosis fisiológicas de corticosterona. En los animales, una mutación puntual que impida la dimerización del receptor de glucocorticoides GR, sugiere que la transcripción génica es necesaria para la consolidación de la memoria. En humanos, tanto jóvenes como ancianos, la memoria reciente se ve alterada por un exceso de corticosteroides. Este último efecto se revierte, en otros casos, con suplementos de cortisol, confirmando que el déficit de memoria está causado por los bajos niveles o por excesivos de corticosteroides. Todos los datos parecen apuntar a que para un correcto funcionamiento cognitivo en humano se requieren niveles moderados de corticosteroides.

Muchos estudios en roedores han mostrado que la relación de ocupación de receptores MR/GR es determinante en la aparición de cambios cognitivos inducidos por glucocorticoides (GCs) (81).

Cada vez más, se tiene conocimiento de que la excitación emocional, provocada en un animal por una nueva situación, aumenta la memorización que provocan los glucocorticoides en el hipocampo y, recientemente, se ha visto (82) que quitando la carga emocional se elimina la acción reforzadora de los glucocorticoides sobre la memoria (82). Joëls M, Pu Z et al.(83) postulan que el es-

trés solamente refuerza un proceso de aprendizaje y memoria cuando a) dicha situación estresante se produce al mismo tiempo que el acontecimiento que necesita ser recordado, b) es decir, cuando las hormonas y transmisores que la respuesta al estrés habilita ejercen su acción por los mismos circuitos que aquellos activados en una situación de aprendizaje, lo cual, naturalmente, sucede, precisamente, cuando la situación de estrés y de conocimiento convergen en el tiempo. De acuerdo con esto, los mecanismos de acción de las hormonas del estrés, particularmente corticoides, explican cómo el estrés, dentro del contexto de una experiencia de aprendizaje, induce focalización de la atención y mejora la memoria informativa del aprendizaje.

Estamos exponiendo los cambios en el almacenamiento de la memoria de aprendizaje que produce el estrés en el cerebro, concretamente, en el hipocampo, y ello, evidentemente, se produce por la interacción, en dicho órgano, a través de los receptores MR y GR, de los glucocorticoides. Por ello, siempre consideramos estrés moderado o normal y estrés crónico, porque, en ambas situaciones, la interacción entre corticoides e hipocampo es distinta en cantidad y en tiempo de acción.

Una de las formas en que las hormonas del estrés modulan las funciones cerebrales es cambiando la estructura de las neuronas, y ello se produce en el hipocampo, el cual es una de las regiones del cerebro más maleable. Las estimulaciones que recibe la región de éste llamada *gyrus dentate* se ramifican hacia la zona hipocampal CA3, constituida por neuronas piramidales. Y ello amplifica las excitaciones, y algo menos las inhibiciones, proporcionando un mayor grado de control al sistema. Como ese tipo de circuitos existe, y constituye el sistema gyrus-CA3, se cree que él juega un papel en la secuencia de acontecimientos de la memoria, si bien en el almacén de ella, a largo tiempo, están implicadas también otras regiones cerebrales Este sistema gyrus-CA3 está delicadamente equilibrado tanto en su funcionamiento como en su vulnerabilidad a posibles daños, es decir, tiene una plasticidad adaptativa. Debido a ella nuevas neuronas continúan siendo producidas en el *gyrus dentate* a través de la vida adulta y, además, las células piramidales de la región CA3 son capaces de soportan una remodelación reversible de sus dendritas en determinadas situaciones como, por ejemplo, en el estrés crónico, la restricción alimentaria o el incremento de la actividad física (84).

El papel jugado por esta plasticidad del hipocampo puede ser para proteger el organismo contra daños permanentes o puede, contrariamente, aumentar la vulnerabilidad a una situación peligrosa. Sea cuales sean sus consecuencias fi-

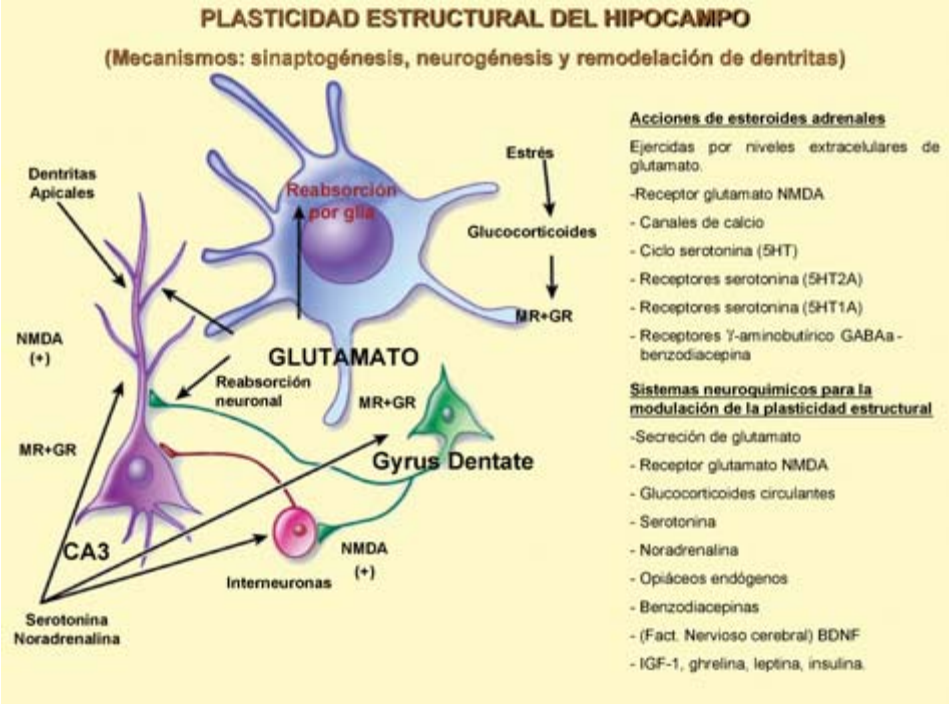


FIGURA 4. *La modificación estructural del hipocampo comprende sinaptogénesis, neurogénesis y remodelación de dendritas. Las acciones comienzan por la llegada de glucocorticoides a los receptores MR y GR) ello modifica los niveles extracelulares de glutamato a través de su receptor NMDA, canales de calcio y ciclo y receptores de serotonina, así como, receptores de GABA. Los sistemas neuroquímicos movilizados están reseñados a la derecha parte inferior de la figura. En todas las acciones realizadas el aumento de glutamato y su reabsorción por la glia ocupa un lugar central. Ver texto. Figura modificada de cita (11).*

siológicas lo que actualmente parece claro es que el hipocampo soporta un número de cambios estructurales adaptativos en la respuesta a un agudo o crónico estrés (11).

La plasticidad estructural del hipocampo envuelve sinaptogénesis, neurogénesis y remodelación de dendritas y los mecanismos que utiliza para estos procesos de remodelación estructural envuelven muchos sistemas neuroquímicos que están sumarizados en la figura 4. Estos mecanismos son resumidamente: secreción y reabsorción de glutamato, activación del receptor de glutamato NMDA (N-metil - D-aspartato) serotonina, norepinefrina, opiaceos endogenos, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), IGF-I, ghrelina y leptina, todos ellos movilizados por los glucocorticoides a través de ambos receptores MR de mineralocorticoides y GR de glucocorticoides (11). El hipocampo es pues una dia-

na para las hormonas del estrés y, también, responde a hormonas gonadales, tiroideas y adrenales, y todas ellas modulan cambios en la formación de sinapsis y estructuras dendríticas además de regular el volumen del *gyrus dentate* durante el desarrollo y en la vida adulta. En el capítulo dedicado a las hormonas ováricas se encuentran detalladas las muchas acciones cerebrales de ellas.

Las dos formas de plasticidad estructural que son afectadas por el estrés son atrofia de dendritas en la región CA3 por estrés repetidos y supresión de neurogénesis por agudo y crónico estrés de las neuronas granulosas del *gyrus dentate*. Y ambas cosas se producen en humano acompañadas de acciones deficitarias sobre la memoria episódica, espacial y contextual (85).

La capa subgranular del *gyrus dentate* contiene células que tienen algunas propiedades de astrocitos y que son capaces de transformarse en neuronas granulares (11). Hay muchos moduladores hormonales, neuroquímicos y, también, de conducta que regulan la neurogenesis en el *gyrus dentate* incluyendo estradiol, IGF-I, ejercicio físico voluntario y, también, el proceso de aprendizaje que depende del hipocampo. Los neuroquímicos están expuestos en la figura 4. Con respecto al estrés, ciertos tipos de estrés agudo, muchos productores de estrés o "estresadores", y, muchas veces, situaciones de estrés psicológico, suprimen la neurogénesis en el *gyrus dentate* y los mediadores de estos efectos inhibidores incluyen como hemos mencionado aminoácidos excitatorios, actuando vía NMDA receptores, y también opiáceos endógenos (Fig. 4).

Otra forma de plasticidad estructural es la remodelación de las dendritas en el hipocampo, amigdala y cortex prefontal. En el hipocampo, el estrés crónico produce retracción y simplificación de dendritas en la región CA3 del hipocampo (85). En animales se ha visto que estrés psicológico produce lo mismo.

La exploración de los mecanismos que subyacen a esta remodelación de dendritas y sinapsis conduce a que no es el tamaño adrenal o las presuntas acciónes fisiologicas del estrés "per se" lo que determina la remodelación de las dendritas, sino una compleja cantidad de otros factores, los mismos que también intervienen en la regulación de la neurogénesis.

En las especies de mamíferos que hibernan, la remodelación de las dendritas es un proceso reversible que ocurre en unas horas en el comienzo de la hibernación, como sucede en los osos, y es también reversible en unas horas cuando termina dicho proceso Ello implica que la reorganización del citoesqueleto se realiza rápida y reversiblemente y que los cambios en longitud y ramificación de las dendritas no pueden considerarse, realmente, una perturbación, sino que solamente muestran la plasticidad estructural.

Los esteroides adrenales son modeladores importantes del estrés y por ello exógenos esteroides adrenales, dados en inyección, pueden modular también el hipocampo, aún en ausencia de un agente estresante (86). Los esteroides adrenales interactúan, pues, en el hipocampo con sistemas neuroquímicos, expuestos anteriormente (Fig. 4), y en estas interacciones tienen un papel central los aminoácidos excitatorios como el glutamato y la regulación de su secreción (85).

Entre las consecuencias del estrés crónico la elevación de los niveles extracelulares de glutamato conduce a la inducción de transportadores gliales de glutamato, así como incrementa la activación del factor de transcripción nuclear fosfo-CREB o elemento de respuesta a los receptores de corticoides (2). Incremento de la expresión de proteinas presinapticas y otros acontecimientos, sugieren incremento de la secreción de glutamato. También moléculas extracelulares juegan un papel en la remodelización dendrítica. Como lo hace el activador plasminógeno de tejidos (tPA) que es una proteasa extracelular que se secreta en la actividad neuronal y que se necesita para que el estrés crónico induzca perdidas de espinas dendríticas y del receptor NMDA de glutamato, sobre todo en las neuronas de la región CA1 del hipocampo (87). Factores neurotróficos también juegan un papel remodelando la longitud y la ramificación de las dendritas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o el factor de crecimiento nervioso (NGF). El BDNF y la corticosterona parecen oponerse uno al otro en sus acciones. BDNF revierte la reducida excitabilidad en las neuronas del hipocampo, la cual es inducida por los niveles de corticosterona del estrés en la rata (11).

Otra hormona, la corticotrofina hipotálamica CRF, la cual es un mediador clave en el estrés porque, como hemos expuesto, regula el axis hipotálamo — pituitaria- adrenal, estimulando en hipófisis la secreción de corticotrofina ACTH, también está, en la parte central de la amígdala, envuelta en el control de la conducta y en las respuestas del sistema nervioso autónomo. El CRF es expresado, en momentos del desarrollo hipocampal, en neuronas gabaérgicas y, en situaciones de estrés, durante etapas de desarrollo, produce un efecto retardatorio en la función cognitiva y en el número de neuronas de la región CA3, además de en las ramificaciones de las neuronas piramidales del hipocampo (88).

Sin embargo, el hecho de que los efectos del estrés crónico, tanto sobre la morfología del hipocampo como sobre los procesos de aprendizaje, desaparezcan, en animales, después de 1-2 semanas de cesar el régimen diario de estrés, sugiere que dichas perturbaciones son una función adaptativa y no constituyen un daño irreparable (86) Por ello, resulta sugerente pensar que la remodelación de dendritas en el hipocampo no es solamente una adaptación a una situación

de conducta sino, también, posiblemente, una estrategia protectora para reducir impulsos excitatorios y prevenir daños permanentes (85).

En situaciones de estrés repetidas, baja la sensibilidad a los glucocorticoides en el hipocampo. Por ello, los efectos en hipocampo de altas dosis de corticoides inyectadas y las provocadas por situaciones de estrés no son los mismos ni en cuanto a alteraciones morfologicas ni a modificaciones en la capacidad de aprendizaje. Esos efectos, en principio, dependen del aumento del nivel de corticoides que se produzca, de la duración de dicho nivel y también de la edad del animal (89).

3.4.7.2. Amígdala y cortex prefrontal

Junto con otras muchas regiones cerebrales también la amígdala y el cortex prefontal tienen receptores de glucocorticoides (11); sin embargo el papel de los esteroides adrenales, aminoácidos excitatorios y otros mediadores del estrés no ha sido tan estudiado como en el hipocampo. No obstante, se han hecho investigaciones en ambas áreas cerebrales en dos vertientes; bien sometiendo a animales a estrés crónico, o dándoles dosis altas de glucorticoides. En ambos tipos de experimentos los resultados no son idénticos como ocurre en el caso del hipocampo.

Las experiencias que se recuerdan, buenas o malas, son más efectivas y memorizadas cuando conllevan un componente emocional. Así, la memoria de las situaciones de amenaza, sus recuerdos, son más eficaces en el futuro, en casos de carga emocional negativa. Se sabe que la amígdala está íntimamente asociada con la génesis del miedo y otras emociones y con la capacidad de responder a ellas (90). Cuando hay un daño en la amígdala se empobrece el aprendizaje (91). La mejora de dicho aprendizaje mediante administración de glucocorticoides durante la exposición a la situación, se impide si existen lesiones en la amígdala basolateral (92).

Estos efectos de la corticosterona sobre la memoria parecen depender de interacciones con la noradrenalina dentro de la amígdala basolateral (91). Esta crítica interacción entre glucocorticoides y noradrenalina en la amigdala puede explicar porqué los glucocorticoides estimulan selectivamente la memoria de la información emocional y juegan, por ello, un papel importante y positivo en la respuesta a experiencias adversas (91). También la amígdala envía señales a través de la hormona hipofisaria CRH al núcleo paraventricular del hipotálamo que puede modular la regulación del axis HPA (67).

Animales sometidos a estrés crónico presentan cambios funcionales y estructurales tanto en el cortex prefrontal como en la amígdala. El estrés crónico causa acortamiento de las dendritas en el cortex prefrontal (93) sin embargo produce crecimiento de dendritas en neuronas en la amígdala (94) (2).El estrés crónico también incrementa la agresividad entre animales de una misma jaula lo que es otro aspecto de hiperactividad de la amígdala (11). Administración de corticosterona de forma crónica en el agua de bebida produce ansiedad en ratones y un efecto similar se produce por el aumento de CRF (hormona hipotalamica corticotropa) en la amigdala (95), la cual modula la hiperactividad del axis (HPA) con elevación en plasma, finalmente, de corticoides. Por último, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) también parece jugar un papel modulando la actividad de la amígdala, ya que sin añadir ningún otro agente estresante, aumenta la ansiedad en determinados test de conducta incrementando, correlativamente, la densidad de las espinas dendriticas en las neuronas de la amigdala basolateral. Sin embargo, en el hipocampo el BDNF protege contra el estrés en animales acortando las dendritas en la región hipocampal CA3 (11) mostrando, efectos opuestos estructurales en ambas áreas cerebrales (94).

Finalmente, hay que señalar que en todos estos experimentos sobre animales, tratando de observar las diferencias de los efectos del estrés en hipocampo y amígdala, se han encontrado diferencias estructurales y de comportamiento cognitivo según se considere machos o hembras. Todo esto está actualmente siendo muy estudiado ya que nos lleva a la consideración, absolutamente establecida ya, de que las diferencias sexuales son muy importantes para los estudios de las funciones cerebrales (96).

3.4.7.3. Extrapolación al cerebro humano

No podemos detenernos en este punto, pero sí decir que los incentivos para estudiar los efectos del estrés en el cerebro humano vienen de los estudios realizados en animales que acabamos de referir. El extrapolar estos datos a humano es, sin duda, un reto que poco a poco se va consiguiendo con técnicas nuevas como el PET (tomografía por emisión de positrones) o fMRI (imágenes funcionales por resonancia magnética) y, además, observando casos de pacientes en la clínica. Regiones cerebrales como el hipocampo, amígdala y cortex prefontal, muestran imágenes, en pacientes con depresión recurrente, con volumen decrecido de dichas áreas. (97) Las autopsias de pacientes que han sufrido largo tiempo depresiones también muestran evidencia de pérdida de células gliales en la amígdala y cortex prefrontal, así como en hipocampo (11). En el sín-

drome de Cushing, que cursa con niveles altos de cortisol, y en pacientes con grandes depresiones, la duración de la enfermedad, y no la edad del paciente, predice una progresiva reducción del volumen del hipocampo (98). Hormonas del estrés tales como cortisol están siempre envueltas en psicopatologias lo que refleja excitación emocional y desorganización psíquica más que un específico desorden (11).

La mala regularización del cortisol y otros mediadores que forman las redes de la allostasis, que hemos expuesto, posiblemente están jugando un papel en muchos desordenes psiquiátricos así como en los desórdenes sistémicos, tales como diabetes, en los que se pueden presentar, también, manifestaciones psiquiátricas (99). Todas estas cuestiones están dando sustento científico, en las sociedades humanas, para reformar el estilo de vida, evitando estados de estrés innecesarios y procurando ejercicio fisico, vida sana, y dieta adecuada, porque, evidentemente, este coste allostático de los procesos del estrés, está, sin duda, minando nuestra salud a través del cerebro y acortando la supervivencia.

3.4.8. *Programación epigenética de la respuesta al estrés en del desarrollo perinatal*

El eje HPA cambia con la edad. En algunas razas de ratas los niveles de corticosteroides circulantes descienden con la edad, mientras que en otras tienden a aumentar (100). En humanos ocurre algo parecido, así, los ancianos tienden a tener altos niveles de corticosteroides, sobre todo por la noche, mientras que descienden por las mañanas, presentando un ritmo circadiano diurno que puede estar aplanado y desfasado (39). El hipocampo puede ser vulnerable a una acción incrementada de los glucocorticoides (GCs) en personas ancianas, provocando déficit en la función cognitiva asociada a esta área cerebral. En humanos y ratas hay una correlación inversa entre las concentraciones de GCs en plasma y el volumen del hipocampo. De hecho, la memoria verbal está relativamente impedida en individuos de edad con altos niveles de cortisol, lo que puede estar asociado a su menor volumen del hipocampo (39). No está claro si la causa primaria responsable de este descenso funcional es el exceso de (GCs) con la edad o un aplanamiento del ritmo diario, o bien se debe a la permanente exposición a los corticosteroides durante la vida.

Pronto se comenzó a ver que cuando se incrementaba la reactividad emocional y el miedo a situaciones nuevas en ratas jóvenes, cualquiera que fuera la causa, tenía graves consecuencias en su longevidad y en su función cognitiva

en periodo adulto; éstos y otros muchos experimentos en animales llevaron a la conclusión de que los niveles altos de los glucocorticoides circulantes debidos a un axis HPA mal regulado eran causados por una programación perinatal anómala de dicho axis (100).

Por otra parte, más recientemente, se ha podido establecer (2) que la programación del axis corticosuprarrenal (HPA), producida durante el desarrollo, cuando es anómala, parece estar subyacente, y ser un denominador común en las patologías adultas del citado síndrome metabólico adulto, diabetes 2, dislipemias o alteraciones cardiovasculares. Concordante con esto, abusos en la infancia en niños, y malos tratos son un factor de riesgo para depresiones, desordenes postraumáticos, conductas antisociales además de obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares en periodo adulto (101).

Agentes estresantes actuando durante periodos críticos del desarrollo tales como la etapa perinatal pueden afectar conjuntamente, de forma negativa, la conducta y las funciones fisiológicas, incluyendo el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y las respuestas inflamatorias/inmunes (101). La actuación de agentes estresantes ambientales, factores no-genéticos, en etapas tempranas del desarrollo tienen un efecto permanente sobre el organismo, provocando una organización, irreversible en adulto, de sistemas fisiológicos que ha sido definida, al principio de esta exposición, como *programación perinatal o temprana* (102).

En los humanos, retardo intraútero de crecimiento, y, por tanto, bajo peso al nacimiento, se considera, en la clínica, un índice de estrés prenatal con posibilidad de alteraciones cardiovasculares en etapa adulta(102). Sin embargo, estos niños provienen de una madre que ella misma está estresada, por ello se considera, para sus hijos, que el estrés no solamente es prenatal sino perinatal, y se habla, en consecuencia, de programación perinatal. Desde el punto de vista de los procesos de estrés, uno de los más importantes actores para la regulación del axis HPA son los glucocorticoides, y ello sugiere que el aumento de los glucocorticoides de una madre estresada subyace en la correlación que se encuentra entre bajo peso al nacimiento y las patologías relativas a los estados de estrés, como son los desórdenes cardiovasculares, metabólicos o neuroendocrinos tales como hipertensión, diabetes 2, isquemias, así como diferentes tipos de desordenes cognitivos y de conducta, de los que ya hemos hablado (48) Igualmente, se conoce que la conducta maternal, en periodo postnatal, juega un papel crítico en respuestas al estrés en animales, o sea, en los procesos allostáticos, y en las conductas relativas a ellos que ya se han señalado (103).

Pues bien, el cerebro inmaduro, que rige la regulación del axis HPA, es muy sensible a estos factores perinatales que *programan* y sabemos que los glucocorticoides maternos secretados en determinadas conductas de la madre, pre y postnatalmente, tienen poderosas propiedades y aptitudes para dicha programación (38). Además, recientemente, en grupos humanos, se han presentado estudios que muestran que si una madre es estresada durante la gestación o después del parto, su hijo tiene más posibilidades de tener problemas emocionales o cognitivos, incluyendo déficit de atención, desórdenes de hiperactividad, ansiedad, así como retardo en la adquisición del lenguaje (104). Sin embargo, en humano, se sabe poco de las consecuencias de experiencias adversas en etapas tempranas sobre la respuesta al estrés a largo plazo y sobre los mecanismos allostáticos que se habilitan. Por razones éticas es muy difícil realizar dichos estudios en la especie humana y por ello se han ido estudiando, especialmente, las consecuencias neurobiologicas del estrés perinatal en modelos animales (38) (103).

El grupo de Maccari S. lleva unos veinte años estudiando en animales (48) las consecuencias a largo plazo de restricciones prenatales y postnatales por estrés (PRS) (*perinatal restraint stress*) sobre la regulación y actividad del axis HPA y sobre las alteraciones del ritmo circadiano de los corticoides. Han establecido un modelo de depresión en ratas muy riguroso utilizando machos y hembras, en el cual estudian los síntomas neurobiológicos de la depresión, por supuesto, no el síntoma de depresión en sí, ya que éste incluye cambios de carácter que claramente no pueden ser reproducidos en animales, puesto que, además, la etiologia de la depresión constituye, en humano, una enfermedad psiquiátrica compleja. El fin de estos investigadores es estudiar, en el modelo animal, los mecanismos que subyacen en el tratamiento de antidepresivos que son utilizados para determinados síntomas de depresión humana, tratando con todo ello de desarrollar drogas más eficaces. Este grupo estudia en sus modelos las alteraciones del ritmo circadiano de los animales sometidos a prenatal restricción por estrés, e intentan establecer su paralelismo con estados de depresión. Encuentran, junto con muchos otros autores, que la exposición prenatal a un estado de estrés produce un axis mal regulado que cursa con niveles altos, y sostenidos en plasma, de glucocorticoides lo cual es causado por la disminución en el hipocampo adulto de ambos tipos de receptores de corticoides los MR, de mineralocorticoides, y los GR de glucocorticoides (2) (105). Encuentran, además, que las alteraciones patofisiológicas son dependientes del sexo del animal, es decir presentan dimorfismo sexual.

Cuando analizan todos sus resultados, junto con muchos otros investigadores (48), concluyen que la restricción prenatal, el estado estresante, conduce, a

largo termino, en periodo adulto, a alteraciones del ritmo circadiano de corticoides y de los procesos allostáticos los cuales permanecen siendo de alto nivel en estos animales hasta su vejez Dicho sintéticamente, la restricción prenatal debida al estrés, presenta en estos animales una "carga allostática", un alto coste cuando los animales estudiados tratan de adaptarse, también en periodo adulto, a cualquier cambio estresante. Conjuntamente, muestran incrementada su ansiedad, y tienen una actitud depresiva, alta vulnerabilidad ante las drogas y dañada su capacidad de aprendizaje en la vejez. De forma interesante, la respuesta de hembras adultas es menos clara ante el estrés prenatal, porque a pesar de presentar hiperactividad en el axis HPA, como los machos, ellas tienen reducida ansiedad en su conducta, y una mejor capacidad de aprendizaje (48). Estos autores completan las observaciones relatadas estudiando muchos parámetros en los mismos animales, que tratan de mostrar lo que ocurre en la estructura hipocampal. Puesto que, como hemos dicho, el hipocampo está implicado en la regulación del axis HPA y, además, en procesos cognitivos y en memoria espacial. Estudian la expresión de receptores MR/GR en dicha región cerebral. Encuentran reducida la neurogénesis hipocampal en los machos y destrucción de la correlación inversa que existe, en animales normales, entre una conducta hiperactiva al estrés y expresión de una proteina inmuno reactiva (la c-FosIR)) que se utiliza como marcador de actividad neuronal. Muestran en su trabajo que el mRNA tanto de receptores de mineralocorticoides MR como el de glucocorticoides están disminuidos en el hipocampo de machos adultos cuando han padecido estrés prenatal y también que la expresión c-Fos IR, que normalmente aumenta en ratas normales estresadas, no lo hace en los machos que fueron sometidos a estrés persistente prenatal. Y ambas alteraciones las encuentran en estos animales machos tanto en la región CA3 como en el *gyrus dentate* del hipocampo; todo lo cual sugiere reducción de la plasticidad neuronal. Posteriormente, se ha encontrado, en machos sometidos a estrés persistente prenatal, reducida la neurogenesis en hipocampo junto con un incremento de factores neutróficos como el BDNF, factor neutrófico derivado del cerebro, probablemente, en este caso, como un efecto compensatorio a la reducción de neurogénesis. (106). El estrés prenatal (PRS) también reduce la expresión y actividad de los receptores de glutamato (mGlu5) que están implicados en la regulación de la plasticidad sináptica y la neurogénesis (106). Contrariamente, en el trabajo de Maccari (48) encuentran en hembras con persistente PRS un aumento de la neurogénesis hipocampal y de la expresión de receptores de glutamato anteriormente mencionados, a pesar de tener estas hembras disminuidos, como los machos, los receptores de corticoides MR y GR anteriormente citados. Así que parece existir, después de estrés persistente prenatal, un substan-

cial impacto en la plasticidad estructural del hipocampo en los machos que no se encuentra en hembras, las cuales están probablemente protegidas por incremento de astrocitos y de receptores metabotróficos de glutamato. O, probablemente, por la existencia de las hormonas ováricas (ver capítulo siguiente de la monografía).

Hemos expuesto anteriormente las acciones devastadoras de la falta de sueño y cómo en un estrés crónico termina por producirse el insomio como un coste allostático de la respuesta al estrés, todo ello en periodo adulto y siempre con tasas circulantes altas de glucocorticoides; pues bien, la persistencia perinatal del estrés en los animales induce, en periodo adulto, alteraciones del sueño unidas a una tendencia a la obesidad. Y, en estudios epidemiológicos, en humano, se ha encontrado que, en pacientes, la falta de sueño marca el riesgo de obesidad. Y es que, sin duda el sueño, es un marcador de riesgo de obesidad. El sueño, además, juega un gran papel en el balance energético. En el hipotálamo se han encontrado neuropéptidos excitatorios, como la orexina o hipocretina, que provocan la vigilia y abren el apetito y ello sienta las bases moleculares para la comprensión de las interacciones entre alimentarse y dormir (48). Existe una correlación positiva entre restricción de sueño y obesidad y también entre ansiedad y desordenes en la ingesta (48). La perdida crónica de sueño puede ser un mediador entre ansiedad y desordenes en la alimentación. Las dos hormonas, ghrelina y leptina, envueltas, respectivamente, en abrir la primera y cerrar la segunda el apetito a través del cerebro, se han encontrado alteradas durante la falta de sueño y ambas parecen tener un papel significativo en la regulación de la ansiedad (107).

Pero no tenemos que olvidar que acabamos de establecer que los receptores de hormonas metabólicas como la leptina, la insulina, la ghrelina o los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1), se expresan en el hipocampo, la región cerebral diana de las hormonas del estrés, y, a su vez, son péptidos muy importantes para la regulación del balance nergético a través del cerebro (74).

Es fácil de comprender que nutrición pobre, infecciones, anemia, hipertensión, inflamación o diabetes gestacional modulan en la madre factores hormonales, factores de crecimiento y citoquinas que pasan al feto. Y ellos van a alterar parámetros metabólicos fetales que perdurarán en la vida adulta, resultando, entonces, alteraciones de la homeostasis de la glucosa, resistencia a la insulina alteraciones cardiovasculares o diabetes 2. Pero, sobre todo, los estados de estrés maternos alteran los niveles de glucocorticoides fetales, y ello programa de forma anómala el axis HPA. Resultando, además, en los fetos a término, una disminución de peso de cuerpo, de adrenales y de peso pancreático (48).

El hipotálamo juega un papel rector en la regulación de la ingesta y, por tanto, en el peso del cuerpo, y recientes trabajos han definido los circuitos del hipotálamo que median muchos de los efectos de la hormona adipocítica leptina sobre la apertura del apetito, así como la homeostasis glucídica. Muy recientemente, se ha establecido la evidencia, por estudios en ratón, que estos circuitos, estas proyecciones "metabólicas" parten del núcleo arcuato hipotalámico, y, en dicha especie de ratón, se desarrollan después del nacimiento y permanecen estructural y funcionalmente inmaduros hasta la segunda semana de vida (108). Se piensa que la leptina parece jugar un papel crucial neurotrófico en el desarrollo de esos circuitos que regulan en hipotálamo la ingesta y la adiposidad. Esta actividad neurotrófica de la leptina parece estar, en los roedores, específicamente restringida a un periodo critico neonatal, el cual coincide con un aumento, una oleada, de ella en el neonato. El tiempo y la amplitud de este aumento neonatal de leptina tiene consecuencias importantes para regular el peso y la homeostasis glucídica en la vida adulta (45) (108).

En 2005 (109) se ha publicado un trabajo de Vickers, Gluckman y colaboradores que muestra que la administración neonatal de leptina evita la insulinresistencia y la obesidad que se presenta en animales pequeños al nacimiento cuando, posteriormente, son realimentados con abundante dieta. Argumentan que es posible que la subnutrición maternal produzca hipoleptinemia en la madre en un momento crítico del desarrollo fetal y que esta reducción en leptina inicie en el feto una cascada de adaptaciones, Pero no miden la leptina del propio feto, secretada por él, que, probablemente estará disminuida (3).

En la rata parece que una pronta etapa postnatal es el momento adecuado para revertir con leptina el programa de desarrollo establecido en el feto malnutrido. En el momento actual los mecanismos para esa reversión del programa no están claros. Pero si que se ha mostrado que los animales deficientes en leptina tienen reducidas las conexiones neurales de los circuitos que existen en animales normales, citados antes, entre el núcleo hipotalámico arcuato y otros núcleos hipotalámicos implicados en la homeostasis energética (110). Se ha podido comprobar, también, que dichas proyecciones pueden ser restablecidas por tratamiento exógeno de leptina administrada durante su periodo neonatal (3) (110) (111).

Se sabe, además, que el persistente estrés crónico en adultos reduce los niveles de leptina, y es bien conocida la activación por la leptina de la expresión hipotalámica de transcriptos como la proopiomelanocortina/ cocaina (POMC/CART) anorexigénico que cierra el apetito y la inhibición del neuropéptido Y / proteína agouti (NPY/AgRP) que abre el apetito a través del cerebro (74). Así que ello podría ser un mecanismo por el cual el estrés crónico cierra el apetito.

En modelos animales se ha encontrado que el estrés crónico perinatal (PRS) provoca, además de una respuesta desmesurada al estrés en los machos en su periodo adulto, un anormal ciclo circadiano y disfunciones del sueño, sin embargo, las hembras sometidas a PRS parecen mejor protegidas en cuanto a ansiedad y a perturbaciones de memoria o neurogénesis hipocampal.

El hecho de que el estrés maternal pueda producir alteraciones graves en la programación del axis HPA en los fetos, ha sido estudiado muy extensamente en animales y hoy está totalmente conocida la gran importancia del aumento de los glucocorticoides maternales que pasan al feto, puesto que se han hecho experimentos con animales adrenalectomizados. Pero, además, se ha visto que el estrés crónico y persistente (PRS) provoca la disminución de la actividad placental 11-βhidroxiesteroide deshidrogenada tipo 2 que, como ya hemos expuesto, es una barrera enzimática placentaria para proteger al feto de los glucocorticoides maternales, puesto que inactiva los glucocorticoides activos y los transforma en inertes, y, por tanto, incapaces de unirse a sus receptores específicos y actuar. Todo ello está diciendo que el estrés maternal deja al feto indefenso frente a los glucocorticoides maternales que además de estar muy altos, en caso de estrés maternal, no van a ser inactivados por la barrera enzimática placentaria de una forma normal.

Hay que hacer constar, aunque no es el tema de este capítulo, que estamos exponiendo las respuestas al estrés moduladas, en etapas de inmadurez del organismo, por factores ambientales externos, que, finalmente, interactúan con el genoma heredado, pero, evidentemente, el genoma heredado, en muchos casos, puede tener características; por ejemplo diferencias en el alele de un gen, mutaciones etc. que, de forma congénita, puedan determinar la respuesta de un determinado organismo al estrés, al margen de la influencia de factores epigenéticos.

A lo largo de toda esta última parte de la exposición se ha venido señalando que en la manera de afrontar una situación de estrés, hay diferencias fundamentales según se trate de un macho o una hembra, y que los organismos hembra parecen proteger mejor a su hipocampo de los efectos del estrés que inciden sobre su plasticidad.

En este mismo año 2009 (30), existen trabajos tratando de dilucidar y afrontar el estudio de estos dimorfismos sexuales. Estos trabajos contemplan cómo las mujeres en su edad reproductora son más vulnerables a la depresión y a los desordenes de ansiedad que los hombres; la frecuencia es de dos a tres veces más alta en mujeres y esta frecuencia se iguala a la de los varones después de la menopausia femenina.

Debido a las variaciones en niveles de estrógenos durante su vida reproductora en las hembras, y a las diferencias entre machos y hembras para la regulación del axis gonadal (15), los estudios de esta falta de similitud en sus respuestas al estrés en ambos sexos, se han centrado en la cuestión de los niveles variantes de estradiol plasmáticos de las mujeres, y en general en los niveles de las hormonas ováricas estradiol y progesterona, durante sus distintas etapas vitales. Todo ello, además, porque los estrógenos pueden pasar la barrera hematoencefálica y, como mencionamos al principio, unirse a receptores estrogénicos ERs que están ampliamente expresados en el sistema límbico; hipocampo, amígdala o cortex prefrontal, además de en hipotálamo. Y, sobre todo, porque las hormonas ováricas tienen, como se expone en el capítulo siguiente de esta monografía, acciones cerebrales muy importantes.

Utilizando ratas hembras ovariectomizadas a las que luego se inyectan o no estrógenos y se someten a situación de estrés, se puede observar la modulación del estrógeno a dicha respuesta que depende, además, de su concentración. En estos trabajos se establecen, firmemente, los distintos efectos estructurales del estrés crónico sobre neuroplasticidad y actividad cerebral en ratas macho y en hembras. Y todo ello muestra el posible papel protector de los estrógenos.

Estos trabajos (30) establecen que el cerebro femenino tiene otras estrategias, diferentes del masculino, para enfrentarse al estrés. En este momento hay ya evidencias, en roedores, de que el cerebro femenino se enfrenta al estrés con conductas y respuestas fisiológicas diferentes al masculino lo que puede ser atribuido a diferencias anatómicas, influencias hormonales y factores ambientales.

Por no alargar la exposición, solamente diremos que, como enunció Taylor en el año 2000 (112), estos estudios muestran que la respuesta del organismo masculino ante el estrés es "lucha o vuela" pero en el femenino se podría sintetizar en "vigila y protege" (*tend and befriend*). También se muestra la importancia, en situación de emergencia, del soporte social; la compañía, que es importante para el organismo femenino y cuenta mucho menos en el masculino.

Básicamente, estos estudios muestran que el estrés crónico, en machos, aumenta la actividad neural en varias regiones límbicas: hipocampo, amigdala etc, mientras dicha actividad decrece en hembras, pero, ambos géneros, muestran, después del estrés, incrementada la actividad en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PNV) que, sin embargo, es modulada por estrógenos, y por ello se reduce la respuesta en ratas ovarectomizadas sometidas a estrés. En ambos géneros incrementan, ante el estrés, los niveles de corticosterona de forma similar, aunque los niveles basales de las hembras fueran más altos.

Estos trabajos establecen, pues, de forma tajante, que no se pueden usar cerebros masculinos o su fisiología para tratar de explicar mecanismos neurobiológicos subyacentes en las patologías del estrés femenino. Por consiguiente, los desordenes relativos al estrés en mujeres deben ser tratados con drogas específicamente establecidas para neuropatologías femeninas.

Los cerebros masculino y femenino son anatómicamente diferentes a pesar de su identidad macroscópica. El tamaño del cerebro en hombres es más grande pesa 1500g, y el de la mujer 1200g. El corpus callosum tiene más fibras en el cerebro femenino lo que sugiere más fuerte comunicación bilateral (113) entre los hemisferios. El locus coeruleus, el principal núcleo noradrenérgico del cerebro, contiene más células noradrenérgicas y es más grande en las hembras (114). El estudio de neuroimágenes utilizando Imágenes funcionales por Resonancia Magnética (fMRI) para estudiar la neurobiología de trabajos de memoria y otras vertientes cognitivas muestran actividad bilateral cerebral en hembras y unilateral en machos (115). Estas diferencias anatómicas llevan ya a la conclusión que los cerebros masculino y femenino han de ser tratados como entidades diferentes lo cual debe tenerse muy en cuenta en clínica, ya que el cerebro femenino utiliza estrategias y diferentes circuitos neurales subyacentes para enfrentarse al estrés (30).

4. CONCLUSIONES

Los conceptos actuales de respuesta al estrés para mantener el equilibrio orgánico se han ampliado y se ha acuñado el término ALLOSTASIS que significa "mantenimiento del equilibrio dentro de un cambio", además, dichas respuestas se han centrado absolutamente en el cerebro. La importancia de la buena regulación del axis hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), y las patologías que de su alteración pueden derivarse, ha colocado nuevamente a este axis, junto con el sistema nervioso autónomo, en un lugar central de dicha respuesta, tal como ya sugería Selye en 1936 (32). Los estudios de los procesos de respuesta al estrés —*allostáticos*— están haciendo revisar incluso el concepto de salud y enfermedad. La salud, desde dicho punto de vista, parece conseguirse por un proceso adecuado de adaptación a agentes estresantes a lo largo de la vida de un organismo. Estos agentes pueden ser, fundamentalmente, infecciones, desequilibrios internos, patología de un órgano o situaciones psicosociales desventajosas (11). En las respuestas al estrés así como en la regulación del axis HPA el cerebro ocupa un lugar indiscutible. El deterioro orgánico por la edad puede concebirse como un acúmulo de *costes allostáticos* establecidos a lo largo de la vida. Estos costes se producen por una mala o desfasada adaptación al estrés. Y la calidad de la adaptación para

un organismo buena o mala parece, cada vez con más rigor, que se establece en etapas tempranas y es debida a la programación del *epigenoma,* en etapas perinatales, o bien al propio genoma, heredado de forma congénita, y que antes de dicha programación ya es deficiente o está alterado para la adaptación. En ambos casos el genoma heredado está, de manera decisiva rigiendo el modo y la manera de adaptarse al estrés junto con los factores epigéneticos, ambientales, que rodean las etapas tempranas del desarrollo y que son establecidos, primordialmente, por la madre gestante, por sus hormonas o su alimentación fundamentalmente.

El dimorfismo sexual en los procesos allostáticos parece determinado por la presencia de las hormonas ováricas interactuando con el cerebro femenino, en circunstancias que son muy distintas para el otro sexo. y cuyo estudio estamos comenzando a desarrollar.

Pero como se expone en trabajos recientes, todo ello nos lleva a considerar entidades distintas a los cerebros masculino y femenino. Y todos estos conceptos suponen la necesidad, en el futuro, de utilizar distintos abordajes terapéuticos, para determinadas enfermedades, en los organismos sexualmente diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Barker, D.J.P., Erikson, J.G., *et al*. (2002). Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Internacional J. of Epidemiology* 31: 1235-39.

(2) Pascual-Leone, A.M. (2008). Síndrome metabólico y desarrollo perinatal: alteraciones corticosuprarenales En: Desarrollo perinatal origen de patologías adultas Edts. A.M. Pascual-Leone y J.M. Medina. Monografía XXIII*, Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España y Fundación Areces*, pág. 27-69.

(3) Pascual-Leone, A.M. (2008). Desarrollo de mamíferos a la luz de los conocimientos científicos actuales: su interés sanitario. Discurso leído en Sesión Inaugural el 17 de enero 2008 en *Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España*, pág. 1-60.

(4) Hanson M., Gluckman, P. 2nd World Congress on Fetal Origins of Adult Disease, Brighton, UK Junio 7, 2003. *Pediatric Research,* 55: 867-97.

(5) Nathanielsz, P.W., and Padmanabhan V. (2006). Developmental Origin of Health and Disease Editorial. *J. Physiol*. 572: 1 pág.

(6) Rivero, F., Goya, L., Alaez C., and Pascual-Leone, A.M. (1995). Effects of undernutrition and diabetes on serum and liver mRNA expression of IGFs and their binding proteins during rat development. *J. of Endocrinology*, 145: 427.

(7) Goya, L., Pascual-Leone, A.M., *et al*. (1996). Effects of refeeding of undernourished and insulin treatment of diabetic neonatal rats on IGFs and IGFBPs. *American J. of Physiology* 271(Endocrine and Metabolism) E223-231.

(8) Goya, L., Pascual-Leone, A.M., *et al*. (1999). Liver mRNA expression of IGF I and IGFBPs in adult undernourished diabetic rats. *Life Sciences*, 64: 2255.

(9) Goya, L., Pascual-Leone, A.M., *et al*. (1999). Regulation of IGF I and II by glucose in primary cultures of fetal rat hepatocytes. *J. Biol. Chemistry*, 274: 24633.

(10) Ramos, S., Goya, L., Pascual-Leone, A.M., *et al*. (1998). Mechanism of hypothyroidism action on insulin-like growth factor-I and II from neonatal to adult rats: insulin mediates thyroid hormone effects in the neonatal period. *Endocrinology*, 139: 4752.

(11) Mc Ewen, B.S. (2007). Physiology and Neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 87: 8.

(12) Simerly, R.B. (2002). Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in mammalian forebrain. *Ann. Rev. Neurosc*. 25: 507-36.

(13) Pfaff, D.W. (1970). Nature of sex hormones effects on rat sex behaviour: specificity of effect and individual patterns. *J. Comp. Physiol*. 349-58.

(14) Mc Ewen, B.S. (1976). Interaction between hormones and nerve tissue. *Scientifique American*, Julio pág. 48-58.

(15) Pascual-Leone, A.M. (2009) Diferenciación sexual: el factor de Jost *An. R. Acad. Nac. Farm*. 75(3): 419-66.

(16) Gorski, R.A., and Wagner, J.W. (1965). Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinol*. 76-226.

(17) Hampson E. (1990.) Estrógen-related variations in human spatial and articulatory —motors skills. *Psychoneuroendocrinology* 15: 97-111.

(18) Kendall, D.A., Stancel, G.M., *et al*. (1982).The influence of sex hormones on antidepressant-induced alterations in neurotransmiter receptor binding. *J. Neurosci*. 2: 354-360.

(19) Schneider, I.S., Small, G.W., *et al*. (1997). Estrogen replacement and the response to fluoxetine in a multicenter geriatric depression trial. *Am. J. Geriatr. Psyquiatry* 5: 97-106.

(20) Mc Ewen, B.S., and Alves, S.E. (1999). Estrogen actions in the Central Nervous System. *Endocrine Rev*. 20(3) 279-307.

(21) Mangelsdorf, D.J., Thummel, C. *et al*. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-39.

(22) Kuiper, G.G., J.M., Enmark, E., *et al*. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 93: 5925-5930.

(23) Shupnik, M.A. (2002). Oestrogen receptors, Receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary —axis. *J. of Neuroendocrinol*. 14: 85-94.

(24) Mitchner, N.A. Garlick, C., *et al*. (1998). Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinol*. 139: 3976-83.

(25) Nishimara, E., Nagayama, Y. *et al*. (2000). Ontogenic changes in the expression of estrogen receptor α and β in the rat pituitary gland detected by immunochemistry. *Endocrinol*. 141: 615-20.

(26) Gazzaley, A.H., Weiland, N.G., *et al*. (1996). Differential regulation of NMDAR 1 mRNA and protein by estradiol in the rat hipoccampus. *J. Neurosci*. 16: 6830-6838.

(27) Pfaff, D., Arnold, A., *et al*. edits. (2002). Hormones, Brain and Behaviour. *San Diego. Academic. Press*.

(28) Mc Ewen, B.S. (2001). Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanism. *J. Appl. Physiol*. 91: 2785-801. Invited reviews.

(29) Sellix, M.T., Egli, M., *et al*. (2004). Ovarian steroid hormones modulate circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity. *Brain Research* 1005: 164-81.

(30) Ter Horst, G.J., Wichmann, R. *et al*. (2009). Sex differences in stress response: focus in ovarian hormones. *Physiol . Behav*. doi: 10.1016 / *j.physiolbeh*.2009,02.036.

(31) Reichstein, T., Laqueur, E., *et al*. (1936). Eine wirksame kristallinische Substantz aus der Rinde der Nebenniere, Corticosterone. *Proc. Kon. Akad. Wetensh*. 39: 1218-1219.

(32) Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138,132.

(33) Hench, P.S., Kendall, E.C., *et al*. (1950). Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other contitions. *Arch. Med. Int*. 85: 645-666.

(34) Young, A.H., Gallagher, P., *et al*. (2004). Improvement neurocognitive function and mood following adjunctive treatment with mifepristone (RU-486) in bipolar disordes. *Neuropsychopharmacology* 29: 1538-45.

(35) Kloet, E.R., De Jong, I.E.M. *et al*. (2008). Neuropharmacology of glucocorticoids: focus on emotion,cognition and cocaine. *European Journal of Pharmacology* 585: 473-62.

(36) Munck, A., Guyre, P.M., *et al*. (1984). Physiological function of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrin Rev*. 5: 25-44.

(37) Speirs, H., Seckl, J.R., *et al*. (2004). Ontogeny of glucocorticoid receptors and 11βhydroxiesteroide -dehydrogenase Type I gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoids susceptibility during development. *J. of Endocrinol*. 161: 105-116.

(38) Seckl, J.R. (2004). Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *European J. Endocrinol*. 151: 149-62.

(39) Herbert, J., Goodyer, M., Seckl, J.R., *et al*. (2006). Do corticoids damage the brain*?* *J. of Neuroendocrinol*. 18: 393-411.

(40) Hatfield, C.F., Herbert, J., *et al*. (2004). Disrupted daily activity /rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer´s dementia. *Brain* 127: 1061-74.

(41) Trapp, T., Holsboer, F. (1996). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increase the functional diversity of corticoid action. *Trends Pharmacol Sc*. 17: 145.

(42) Karst, H., Jöels, M. *et al*. (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for no-genomic modulation of hippocampal glutamate transmition by corticosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 102: 19294-207.

(43) De Kloet, E.R., Karst, H., *et al*. (2008). Corticoid hormones in the central stress response: quick and slow. *Frontiers in Neuroendocrinol*. 29: 268-72.

(44) De Kloet, E.R., Jöels, M., *et al*. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosc*. 6: 463-75.

(45) Khaksari, M., Rashidy-Pour, A., *et al*. (2007). Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone-indiced impairment of memory retrieval in rats. *Neuroscience* 149: 729-38.

(46) Kort, S.M., Mc Ewen, B.S., *et al*. (2005). The Darwinian concept of estress: benefits of allostasis and cost of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci. Biohavbe. Rev*. 29: 3-39.

(47) Sterling, P. and Eyer, J. (1988). Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher, S., Reason, J. (Eds.) *Hansdbook of Life Stress, Cognition and Health* . New York. pp. 629-49.

(48) Darnaudéry, M., Maccari, S. (2008). Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Research Rev*. 57: 571-85.

(49) Lynch, J.W. Kaplan, G.A., *et al*. (1997). Cumulative impact of sustained economic hardship on physical, cognitive, psychological, social functioning *N. Engl. J. Med*. 337: 1889-95.

(50) Geronimus, A.T. (1992). The weathering hypothesis and the health of African-American Women and infants: evidence and speculations. *Ethnicity Disease* 2: 207-21.

(51) Mc Ewen, B.S., Weiss, J. *et al*. (1968). Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature* 220: 911-12.

(52) Gerlach, J., Mc Ewen, B.S., (1972). Rat brain binds adrenal steroid hormones: radioautography of hippocampus with corticosterone. *Science* 175: 1133-36.

(53) Eichenbaum, H., Otto T. (1992). The hippocampus: what does it do? *Behavi. Neural. Biol*. 57: 2-36.

(54) Squire, L. (1983). The hippocampus and the neurophysiology of memory In: Neurobiology of Hippocampus des Seifert W. *London Academic*.

(55) Ming, G.L., Song, H. *et al*. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian nervous system. *Ann. Rev. Neurosc*. 28: 223-50.

(56) Altman, J., Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol*. 124: 319-35.

(57) Shors, T.J. (2003). Can new neurons replace memories lost? *Sci. Aging Knowledge Environ*. 49: 35.

(58) Gould, E., Tanapat, P., *et al*. (1999). Neurogenesis in adulyhood: a possible role in learning. *Trend. Cog. Sci*. 3: 186-92.

(59) Meijer, O.C., De Lange, E.C., *et al*. (1993). Penetration of dexametasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdrlAP-glycoprotein knockout mice. *Endocrinol* 139: 1789-93.

(60) Seckl, J.R., *et al*. (2004). Glucocorticoids and 11βhydroxyesteroide dehydrogenase in adipose tissue. *Recent. Prog. Horm. Res*. 59: 359-93.

(61) Seckl, J.R. and Walker, B.R. (2004). Glucocorticoids and 11 βhydroxyesteroide dehydrogenase type 1 as modulator of glucocorticoid action from metabolism to memory. *Trends in Endocrinol. and Metab*. 15: 418-23.

(62) Harris, H.J., Kotelelevtsev, Y., *et al*. (2001). Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11beta - hydroxycortiroide dehydrogenase (11beta - HSD)1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pitutary - adrenal axis: analysis of 11beta-HSD 1-deficient mice. *Endocrinol*. 142: 114-20.

(63) Sandee, T.C., Yau, J.L., *et al*. (2004). 11βhydroxyesteroide dehydrogenase inhibition improves cognitive function in healthy elderly men and type 2 diabetes. *Proc. Acad. Sci. Natl*. USA 101: 6734-39.

(64) Sekl, J.R. (2004). 11beta hydroxyesteroide dehydrogenase changing glucocorticoids action. *Curr. Opin. Pharmacol*. 4: 597-602.

(65) Holmes, M.C., Sangra, M., *et al*. (2005). 11βhidroxyesteroide dehydrogenase type 2 protects the neonatal cerebellum from deleterious effects of glucocorticoids Neuroscience 137: 865-7.

(66) Levitt ,N.S., Lindsay, R.S., *et al*. (2005). Dexametasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoids receptor gene expression and elevates blood pressure in adult offspring in the rat. *Neuroendocrinol*. 54: 412-18.

(67) Owen, D., Marcus, H., *et al*. (2005). Maternal adversity, gluccorticoids and programming of neuroendocrine function and behaviour. *Neuroescience and Behacvioral Reviews* 20: 209-26.

(68) Dore ,S., Kar, S., *et al*. (1997). Distribución y niveles of (I125) IGF-I, (I125) insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-unimpared and impared rats. *Neuroscience* 80: 1033-40.

(69) Piroli, G.G., Grillo, C.A., *et al*. (2002). Peripheral glucose administration stimulates the translocation of GLUTS glucose transporter to the endoplasmic reticulum in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol*. 452: 103-114.

(70) Donahue, C.P., Kosik, K.S., *et al*. (2006). Growth hormone is produced within the hippocampus where it responds to age, sex, stress. *Proc. Natl. Acad. Eci*. USA 103: 6031-36.

(71) Diano, S., Farr, S.A., *et al*. (2006). Ghrelina controls hippocampal spine: synapse density and memory performance. *Nature Science*. 9: 381-88.

(72) Kastin, A.J., Akerstron, V. (2001). Glucose and insulin increase the transport of leptin through the blood-brain barrier in normal mice but not in streptozotocin-diabetic mice. *Neuroendocrinol* 73: 237-42.

(73) Baran, S.E., Campbell, A.M., *et al. (*2005). Combination of hight fat diet and chronic stress retracts hippocampal dendrites. *Neuroreport* 16: 39-43.

(74) Pascual-Leone, A.M. (2005). Control neuroendocrino del balance energético: el adiposito secretor En: Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: patologías. Págs. 23-64 Ed. A.M. Pascual - Leone, Monografía XVIII *Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España*. Madrid.

(75) Bierhaus. A., Wolf. J., *et al*. (2003). A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 199: 1920-25.

(76) Sapolsky .R.M., Romer, L.M., *et al*. (2000). How do glucorticoids influence stress responses? permissive, suppressive, stimulatory, preparative actions. *Endocrin Rev*. 21: 55-80.

(77) Mc Ewen. B.S. (1998). Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med*. 338: 171-79.

(78) Spiegel, K., Tasali, E., *et al*. (2004). Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, increased hunger and appetite. *Ann. Intern. Med*. 141: 846-50.

(79) Guzman-Marin, R., Suntsova, N., *et al*. (2003). Sleep deprivation reduces proliferation of cells in the dentate gyrus of the hippocampus in rats. *J. Physiol*. 549.2: 663-79.

(80) Roman, V., Van der Borght, K., *et al*. (2005). Sleep restriction by forced activity reduces hippocampal cell proliferation. *Brain Research* 1065: 53-59.

(81) De Kloet, E.R., Oitz, M.S., *et al*. (1999). Stress y cognition: are corticoids good or bad guys? *Trend Neurosci*. 22: 422-26.

(82) Okuda, A.K., Roozendaal, B., *et al*. (2004). Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 101: 853-58.

(83) Joëls ,M., Pu, Z., *et al*. (2006). Learning and stress: how does it work? *Trend Cogn. Sci*. 19: 152-58.

(84) Lambert, K.G., Buckelew, K., *et al*. (1998) Activity-stress induced atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal neurons in male rats *Physiol. Behaviour* 65: 43-49.

(85) Mc Ewen, B.S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Ann. Rev. Neurosci*. 22: 105-22.

(86) Sousa, N., Madeira, M.D. *et al*. (1998). Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adults rats. An unbiased stereological study. *Brain Res*. 794: 199-210.

(87) Pawlak, R., Rao, B.S.S., *et al*. (2005). Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA 102: 1801-18206*.

(88) Chen, Y., Bender, R.A., *et al*. (2004) Modulation of dendritic differentiation by corticotrophin-releasing factor in the developing hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 15782-87*.

(89) Wood, G.E., Young, L.T., *et al*. (2004.) Stress induced structural remodelling in hippocampus: prevention by lithium treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 101: 3973-78.

(90) Cahill, L., Weinberger, N.M., *et al*. (2006). Is the amigdala a locus of "conditioned" fear? Some questions and caveats. *Neuron*. 238: 227-2.

(91) Mc Gaugh, J.L. (2004). The amigdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Ann. Rev. Neurosci*. 27: 1-28.

(92) Rozendaal, B., Mc Gaugh, J.L., *et al*. (1997). Basolateral amygdale lesions block the memory enhancing effects of glucocorticoids administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur. J. Neurosci*. 9: 76-83.

(93) Cook, S.C., Wellman, C.L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J. Neurobiol*. 60: 236-48.

(94) Vyas, A., Mitra, R., *et al*. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodelling in hippocampal and amígdaloid neurons. *J. Neurosci*. 22: 6810-18.

(95) Makino, S., Gold, P.W., *et al*. (1994). Corticosterone effects on corticotrophin - releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdale and the parvocellular region of paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Research* 640: 105-112.

(96) Mc Ewen, B.S., Lasley, E.N. (2005). The end of sex as we know it. En: Cerebrum,*The Dana Forum on Brain Science New York Dana Press*.

(97) MacQueen, G.M., Campbell, S., *et al*. (2003). Course of illness, hippocampal function, hippocampal volume in major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1387-1392.

(98) Starkman, M.N., Gebarski, S.S., *et al*. (1992). Hippocampal formation volume, memory dysfunction, cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol. Psychiatry*. 32: 756-65.

(99) Rasgo ,N.I., Kenna, H.A. (2005). Insulin resistance in depressive disorders and Alzheimer´s disease revisiting the missing link hypothesis. *Neurobiol. Aging* 26S: S103-S10107.

(100) Craft, T.K.S., Zhang, N., *et al*. (2006). Neonatal factors influence adult stroke outcome. *Psyconeuroendocrinology*. 31.601-13.

(101) Maccari, S., Morley-Fletcher, S. (2007). Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus- pituitary-adrenal axis and related behaviour and neurobiological alterations. *Psiconeuroendocrinology* 32 (Suppl.1) S10-S15.

(102) Barker, D.J. (1999). Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann. Med.* 31 (Suppl.1), 3-6.

(103) Levine, S. (2002). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behaviour. *Neurotox. Res.* 4: 557-64.

(104) Talge, N.M., Neal, C., Glover, V. (2007). Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J. Child Psychol. Psychiatry* 48: 245-61.

(105) Van Waes, V., Enache, M. *et al.* (2006). Hypo-response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis alter ethanol challenge in prenatally stressed adolescent male rats. *Eur. J. Neurosci.* 24: 1193-1200.

(106) Di Giorgi-Gerevini, V., Melchiorri, D., *et al.* (2005). Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells *.Cell Death Differ.* 12: 1124-33

(107) Seoane, L.M., Al-Massadi, O., *et al.* (2004). Ghrelin: from a GH-secretagogue to the regulation of food sleep and anxiety. *Pedriatic. Endocrinol. Rev.* 1 (Suppl. 3) 432-37.

(108) Bouret, S.G., Simerly, R.B. (2006). Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin. Genet.* 70: 295-301.

(109) Vickers, M.H., Gluckman, P.D., *et al.* (2005). Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology.* 146: 4211-6.

(110) Bouret, S.G., Draper, S.J., *et al.* (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304: 108-10.

(111) Wabitsch, M., Fuchs, M., *et al.* (2006). Obesity and weight regulation In: Cared, J.C., Hochberg Z (eds) *Year of Pediatrc Endocrinology 2006, Karger, Basel,* pp. 149-15.

(112) Taylor, S.E., Klein, L.C.*, et al.* (2000). Biobehavioral response to stress in females: tend -and-befriend, not, fight-or-flight. *Psychol. Rev.* 107: 411-29.

(113) Highley, J.R., Esiri, M.M., *et al.* (1999) The size and fibre composition of the corpus callosum with respect to gender and squchizophrenia: a post-mortem study *Brain* 99-110.

(114) Luque, J.M. de Blas, M.R., *et al*. (1992) Sexual dimorphism of the dopamine-beta-hydroxilase-immunoreactive neurons in the rat locus ceruleus. *Brain Res. Dev. Brain Res*. 67: 211-5.

(115) Bell, E.C.,Willson, M.C., *et al*. (2006) Males and females differ in brain activation during cognitive task *Neuroimage*. 30: 529-38.

* Deseo manifestar que el contenido de la cita (2), de A.M. Pascual-Leone, complementa algunos puntos expuestos en este capítulo.

3. Acciones neuroprotectoras de las hormonas ováricas

ÍÑIGO AZCOITIA*, MARÍA ÁNGELES ARÉVALO**
Y
LUIS MIGUEL GARCÍA SEGURA**

* *Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid;*
** *Instituto Cajal, CSIC, Madrid*

RESUMEN

El estradiol y la progesterona regulan el desarrollo y la función de los sistemas nerviosos central y periférico. Además, las hormonas ováricas, actuando a través de las células endoteliales, las células de glía y las neuronas, ejercen acciones neuroprotectoras en varios modelos animales de patología neural. Sin embargo, las implicaciones clínicas de las acciones neuroprotectoras de las hormonas ováricas en el hombre, son objeto de debate.

ABSTRACT

Estradiol and progesterone regulate the development and function of the central and peripheral nervous systems. In addition, ovarian hormones, acting by several mechanisms on endothelial cells, glial cells and neurons, exert neuroprotective actions in different animal models of neural pathology. However, the clinical implications of the neuroprotective actions of ovarian hormones in humans are still under debate.

DIANAS CELULARES DEL ESTRADIOL Y LA PROGESTERONA EN EL NERVIOSO CENTRAL

Todas las regiones del sistema nervioso central (SNC) se ven afectadas por la acción del estradiol y la progesterona. Aunque el mayor nivel de expresión por célula de los receptores para estas hormonas se encuentra en regiones del encéfalo relacionadas con la regulación neuroendocrina o la reproducción, como el hipotálamo, muchas células en otras regiones del encéfalo, la medula espinal y el sistema nervioso periférico (SNP) también expresan receptores para las hormonas ováricas (1-3). De esta forma, el estradiol y la progesterona regulan, directa o indirectamente, la función de todos los tipos celulares del sistema nervioso.

Las hormonas ováricas y el endotelio cerebral

El cerebro está altamente vascularizado y las células endoteliales juegan un papel esencial al formar una barrera selectiva, la barrera hematoencefálica, que solo permite el acceso de algunas moléculas al SNC. Dos de estas moléculas, esenciales para la función cerebral, son el oxígeno y la glucosa. El estradiol aumenta la expresión del transportador de glucosa-1 en las células endoteliales del cerebro, aumentando el transporte de glucosa. El estradiol también aumenta el flujo sanguíneo cerebral, alterando la resistencia de la microvasculatura cerebral y ejerce efectos anti-inflamatorios en las células endoteliales, reduciendo la formación de moléculas proinflamatorias como las enzimas oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o la ciclooxigenasa 2 (Cox-2). También inhibe la inflamación dependiente del factor nuclear κB (NFκB) en el endotelio y regula la función de las mitocondrias de las células endoteliales cerebrales, mejorando su rendimiento energético y disminuyendo el estrés oxidativo. Por otra parte, los capilares cerebrales están en remodelación durante toda la vida, existiendo una correlación entre la actividad de angiogénesis y la actividad neuronal. La formación *de novo* de vasos sanguíneos es especialmente importante en las regiones de penumbra asociadas a un infarto cerebral. El estradiol promueve la angiogénesis cerebral aumentando la expresión de angiopoietina-1, tanto en condiciones fisiológicas, como en modelos experimentales de isquemia cerebral focal (4,5).

Las hormonas ováricas y la microglía

Las células de glía son una población heterogénea que consta de tres tipos principales: la microglía, la astroglía y la oligodendroglía. Las células de mi-

croglía son de origen mesodérmico y tienen un papel de defensa inmunitaria del SNC. Las células de microglía en reposo tienen una forma muy ramificada y ejercen un papel de vigilancia frente a daños en las neuronas y a la invasión del SNC por agentes infecciosos. Cuando las células de microglía son activadas por alguno de estos factores, retraen sus prolongaciones, expresan moléculas inmunitarias y liberan moléculas pro-inflamatorias. En el caso de una activación extrema, las células de microglía adquieren un fenotipo ameboide y desarrollan actividad fagocítica. En condiciones fisiológicas, las células de microglía intervienen en el remodelado de la estructura cerebral asociado a fenómenos de plasticidad neuronal. En condiciones de daño cerebral, las células de microglía participan en la retirada de restos celulares. Su papel es protector en condiciones de una inflamación aguda. Sin embargo, en condiciones de un daño crónico, como sucede en las enfermedades neurodegenerativas, la activación prolongada de la microglía puede contribuir a aumentar el daño neuronal. El estradiol y la progesterona regulan la actividad de la microglía (6). La microglía parece intervenir en la regulación de la plasticidad sináptica que ejercen el estradiol y la progesterona en el hipocampo, en condiciones fisiológicas, durante el ciclo estral en roedores. Por otra parte, en condiciones de inflamación o daño cerebral, el estradiol y la progesterona reducen la reactividad de la microglía, disminuyendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por estas células. La reducción de la reactividad microglial puede ser un componente muy importante de los efectos protectores que el estradiol y la progesterona ejercen sobre el cerebro, particularmente en casos de inflamación crónica, que es habitual en la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas (7). También se ha sugerido que los efectos anti-inflamatorios de la progesterona sobre la microglía pueden contribuir a la disminución que se produce habitualmente durante el embarazo en la intensidad de los síntomas de la esclerosis múltiple.

Las células de microglía expresan la proteína translocadora de 18kDa (TSPO), antes conocida como receptor periférico de benzodiazepinas (PBR). La expresión de la TSPO/PBR aumenta en la microglía reactiva y algunos ligandos que se unen a la TSPO/PBR se utilizan para detectar la activación de la microglía y la inflamación cerebral con técnicas de tomografía por emisión de positrones. Lo que es interesante ahora para nosotros es que la TSPO/PBR tiene una importante función como regulador de la esteroidogénesis. La TSPO/PBR transporta al colesterol desde la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria en donde se encuentra la primera enzima para la síntesis de esteroides, la P450scc. La TSPO/PBR ayuda de esta manera al colesterol a atravesar el espacio hidrofílico presente entre las dos membranas mitocondriales. Este paso es la etapa limitante común en la síntesis de esteroides. La P450scc trans-

forma el colesterol en pregnenolona, el precursor de progesterona, que puede ser secretado al medio. Por lo tanto, la microglía y en especial la microglía reactiva, es una fuente de pregnenolona para la síntesis local de progesterona dentro del tejido nervioso (6).

Las hormonas ováricas y la astroglía

La astroglía comprende a varios subtipos celulares. Los más abundantes son los astrocitos, células ramificadas de forma estrellada que mantienen contacto con las neuronas, los vasos sanguíneos y las limitantes ependimaria y subpial. Otras formas especializadas de astroglia son las células de Bergmann del cerebelo, cuyas prolongaciones se extienden por la capa granular junto a las dendritas de las neuronas de Purkinje, alcanzando la superficie de la corteza cerebelosa. En el hipotálamo se encuentran otras células especializadas: los tanicitos, cuyo cuerpo se encuentra en el borde ventricular y sus prolongaciones penetran en el parénquima hipotalámico. Estas células se clasifican como astroglía o se consideran como células ependimarias especializadas. Las funciones de la astroglía son muy complejas. Por una parte sus prolongaciones contribuyen a la formación de la barrera hematoencefálica. Por otra, son esenciales para mantener el metabolismo neuronal, ejercen acciones tróficas sobre las neuronas y regulan el contenido del espacio extracelular, evitando la acumulación de metabolitos y iones que puedan alterar la función neuronal. Además intervienen en el control de la actividad sináptica y en fenómenos de plasticidad sináptica. Los astrocitos se conectan unos con otros a través de uniones comunicantes (también conocidas como uniones «gap»), formando así redes funcionales. La activación de los astrocitos en estas redes se efectúa a través de ondas de calcio que producen la liberación de moléculas conocidas como gliotransmisores que afectan a la función de otras células de glía y de las neuronas.

Las células de astroglía son una diana de las hormonas esteroídicas y participan en su metabolismo y en la síntesis local de esteroides dentro del cerebro y la médula espinal. La astroglía expresa la TSPO/PBR y como en el caso de la microglía puede sintetizar pregnenolona. Además convierte la pregnenolona, a través de la enzima 3β-hidroxiesteroide dehidrogenasa en progesterona (6). La progesterona es a su vez transformada en sus metabolitos reducidos dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona gracias al complejo formado por las enzimas 5α-reductasa y 3α-hidroxiesteroide dehidrogenasa. La dihidroprogesterona y la tetrahidroprogesterona median diferentes efectos de la progesterona en el cerebro y la médula espinal por mecanismos diferentes. La dihidropro-

gesterona actúa sobre los receptores de progesterona mientras que la tetrahidroprogesterona actúa sobre los receptores de tipo A del ácido gamma-amino butírico ($GABA_A$) y sobre los receptores del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) del ácido glutámico, dos de los más importantes neurotransmisores del SNC. Por lo tanto, las células de astroglía son responsables de los efectos de la progesterona en la transmisión sináptica, a través de la acción de la tetrahidroprogesterona sobre los receptores de los neurotransmisores (6). De esta manera la progesterona regula la actividad de las sinapsis inhibidoras que usan GABA como neurotransmisor y de las sinapsis excitatorias que usan glutamato como neurotransmisor. Así la tetrahidroprogesterona tiene marcados efectos analgésicos y ansiolíticos, regula la ingesta y el sueño y tiene efectos anti-convulsivos por su acción sobre los receptores $GABA_A$.

Las enzimas 5α-reductasa y la 3α-hidroxiesteroide dehidrogenasa expresadas por la astroglía. también pueden metabolizar a la testosterona. La testosterona se transforma en dihidrotestosterona por la 5α-reductasa y, a su vez, la dihidrotestosterona se convierte en 5α-androstano-3α, 17β-diol (3α-diol), por la enzima 3α-hidroxiesteroide dehidrogenasa. Por lo tanto las células de astroglía contribuyen al metabolismo de los andrógenos en el sistema nervioso, produciendo el metabolito dihidrotestosterona, que tiene alta afinidad para el receptor de andrógenos (6). Además, en condiciones patológicas, los astrocitos, al igual que la microglía, se activan. En estas condiciones los astrocitos expresan la enzima aromatasa que transforma a la testosterona en estradiol (8). En suma, cuando hay un daño cerebral, los astrocitos producen estradiol localmente, a partir de la testosterona circulante. Esta producción local de estradiol tiene efectos neuroprotectores y reduce los efectos del daño cerebral.

Además de contribuir al metabolismo de los andrógenos y la progesterona, las células de astroglía son también una diana de estas hormonas y del estradiol, que pueden actuar directamente sobre la astroglia o a través de los receptores para hormonas sexuales presentes en las neuronas (9). Las células de astroglía expresan receptores de estrógeno α y β, aunque estos receptores están más abundantemente expresados en las neuronas. Además el estradiol y la progesterona pueden modificar la actividad de las células de astroglía a través de la regulación rápida de eventos de señalización mediados por quinasas, como las situadas en las vías de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Las hormonas ováricas también modulan la actividad de la astroglía mediante la modificación rápida de los niveles de calcio intracelular y afectan la señalización glial, regulando la conductancia de las uniones comunicantes. Gracias a estas acciones el estra-

diol y la progesterona modifican también la comunicación entre las células de astroglía y las neuronas, regulando el metabolismo neuronal y la actividad sináptica (6).

El estradiol y la progesterona también regulan la expresión génica en las células de astroglía. Por ejemplo modifican la expresión de proteínas del citoesqueleto y esta acción puede ser relevante para la fisiología normal de los astrocitos. El estradiol aumenta la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y promueve la extensión de las prolongaciones celulares de los astrocitos, en condiciones fisiológicas (6). Estos efectos están asociados a fenómenos de plasticidad sináptica que implican modificaciones en las interacciones de las prolongaciones de los astrocitos con las neuronas en las sinapsis. El estradiol y la progesterona modulan también en los astrocitos, la expresión de moléculas relevantes para el metabolismo celular, como son los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST y una variedad de factores tróficos y citoquinas, que también afectan a la función de las neuronas y de los otros tipos de células de glía (6). Además, el estradiol regula la síntesis de la progesterona en los astrocitos (10).

Las células de astroglía son importantes mediadoras de las acciones neuroendocrinas de las hormonas sexuales. Por ejemplo, el estradiol y la progesterona modulan la síntesis, acumulación y liberación por los astrocitos y tanicitos del hipotálamo, de diversos factores implicados en la liberación de la hormona liberadora de gonadotrofinas, tales como los factores de crecimiento transformantes (TGF) α y β, el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) o el factor de crecimiento similar a insulina-I (IGF-I). El estradiol y la progesterona regulan la expresión o la liberación de estos factores por la astroglía hipotalámica y facilitan la acción de la prostaglandina E2, que es uno de los factores que intervienen en el control de la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas. Además, los tanicitos intervienen en la regulación de la secreción de esta hormona modificando el acceso de los terminales neurosecretores de las neuronas que la liberan a la circulación portal (11).

Como se ha mencionado antes, las células de astroglía también se activan en condiciones patológicas, proliferando y acumulándose en la proximidad de las regiones en las que ocurre un proceso neurodegenerativo. La astroglía reactiva tiene un fenotipo molecular y morfológico diferente del de la astroglía en reposo. El cuerpo celular está hipertrofiado y lo mismo ocurre en las prolongaciones, que a su vez están menos ramificadas que en la astroglía en reposo. El citoesqueleto de las células de astroglía reactiva se modifica en paralelo a los cambios en la morfología celular. Además, la astroglía reactiva expresa y libera una amplia colección de sustancias químicas, que afectan al proceso de re-

paración tisular. La astroglía reactiva tiene efectos protectores y reparadores, produciendo factores tróficos -incluido el estradiol- y participando en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica y la homeostasis tisular, contribuyendo a formar una cicatriz glial alrededor de las zonas lesionadas del sistema nervioso. Sin embargo, lo mismo que ocurre en la microglía, la activación prolongada o descontrolada de la astroglía, puede aumentar el daño neuronal, por la producción de moléculas pro-inflamatorias e impedir la regeneración axonal. El estradiol y la progesterona han demostrado ser capaces de reducir la formación de astroglía reactiva en diversos modelos experimentales de daño en la médula espinal y el cerebro, a base de disminuir la proliferación de la astroglía y la acumulación de astrocitos reactivos en las zonas dañadas. Además, los astrocitos reactivos expresan la enzima aromatasa y pueden producir localmente estradiol. La disminución experimental de la actividad de la aromatasa en el cerebro lesionado provoca un mayor daño neuronal, indicando que la producción local de estradiol por los astrocitos reactivos tiene un efecto neuroprotector. Por otra parte, la lesión cerebral induce la expresión de los receptores estrogénicos en la astroglia reactiva. Por lo tanto, la testosterona puede convertirse en estradiol por los astrocitos reactivos que expresan la aromatasa y, posteriormente, el estradiol puede regular la gliosis por un mecanismo paracrino o autocrino en los astrocitos reactivos que expresan el receptor de estrógenos para regular la gliosis. Además, el estradiol y la progesterona regulan el edema tisular causado por lesiones cerebrales, mediante la regulación de la expresión de la acuaporina-4 en los astrocitos (6,12,13).

Las hormonas ováricas y la mielina

Los oligodendrocitos participan, como los astrocitos, en el control de la actividad sináptica pero su función principal es formar la vaina de mielina que rodea a muchos axones del SNC. En el SNP esta función la ejercen las células de Schwann. La mielina es de color blanco por lo que las regiones del encéfalo y la médula espinal ricas en axones mielinizados se conocen con el nombre de sustancia blanca. La mielina está constituida por una serie de bicapas lipídicas que rodean al axón y que tienen una función de aislante electroquímico. Las prolongaciones de los oligodendrocitos envuelven pequeños segmentos del axón, de forma que una cadena de oligodendrocitos dispuesta a lo largo del axón permite que éste esté mielinizado en todo su recorrido. La mielina, no obstante, se interrumpe al pasar del territorio de un oligodendrocito al siguiente, en un punto conocido como nodo de Ranvier. Esta interrupción es de una importancia

esencial. Las ondas de despolarización mediante las que se propaga el impulso nervioso saltan de un nodo de Ranvier al siguiente, lo que permite un aumento en la velocidad de conducción en los axones que tienen mielina respecto a los axones que no la tienen. Las alteraciones en la estructura de la mielina provocan una disminución en la velocidad de transmisión del impulso nervioso. Por lo tanto, la pérdida de la capa de mielina en enfermedades como la esclerosis múltiple causa trastornos muy graves en la función del encéfalo y la medula espinal, ya que los impulsos nerviosos se transmiten muy lentamente a lo largo del axón o se detienen por completo. Por sus acciones anti-inflamatorias sobre la microglía y la astroglía, el estradiol y la progesterona contribuyen a reducir el daño inflamatorio sobre la mielina en diversas patologías desmielinizantes. Además, el estradiol y la progesterona tienen efectos directos sobre los oligodendrocitos y las células de Schwann (6,14,15).

Igual que la microglía y la astroglía, las células de Schwann y los oligodendrocitos tienen capacidad de sintetizar esteroides (6). Las células de Schwann expresan la TSPO/PBR. Esta expresión aumenta tras una lesión del nervio periférico y vuelve a su nivel basal después de que el nervio ha regenerado, sugiriendo un posible papel de la síntesis local de esteroides en la regeneración nerviosa periférica. Los oligodendrocitos y las células de Schwann son también capaces de metabolizar la pregnenolona en progesterona y de transformar la progesterona en dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona. La capacidad de metabolizar la progesterona se modifica con el estado de diferenciación de los oligodendrocitos, aumentando en los maduros en comparación a la capacidad de sus células progenitoras y precursoras. Los oligodendrocitos también pueden metabolizar la testosterona en su metabolito activo dihidrotestosterona. El estradiol, la progesterona y la testosterona aumentan la proliferación de los oligodendrocitos y la de sus células precursoras y regulan la expresión de proteínas de mielina, tanto en el SNC, como en el SNP. Los efectos pro-regenerativos y pro-remielinizantes de la progesterona han sido particularmente bien documentados en el SNP.

Muchos de los efectos del estradiol y la progesterona sobre los oligodendrocitos y las células de Schwann presentan dimorfismo sexual. Por ejemplo, la densidad de oligodendrocitos y la expresión de proteínas de mielina en tractos de sustancia blanca del cerebro, como el cuerpo calloso y el fornix, y en la sustancia blanca de la médula espinal es mayor en roedores del sexo masculino. Por el contrario, en los animales de sexo femenino, la densidad es menor, pues aunque la tasa de generación de oligodendrocitos es superior, también lo es la de la muerte apoptótica, lo que se traduce en una menor vida media de los oligodendrocitos (6).

Las hormonas ováricas y las neuronas

El estradiol y la progesterona regulan el metabolismo y la actividad neuronal, así comola función sináptica. Muchas neuronas del cerebro y de la médula espinal expresan receptores de andrógenos, estrógeno y progesterona y son una diana directa de estas hormonas. Como ya se ha mencionado, el mayor nivel de expresión de los receptores para hormonas sexuales se encuentra en el hipotálamo, pero muchas neuronas en otras regiones del cerebro y la médula también expresan estos receptores. Las hormonas sexuales pueden ejercer por lo tanto efectos directos en las neuronas. Además, las acciones de las hormonas sexuales en las células de glía y el endotelio vascular, también influencian la actividad neuronal. Finalmente, las hormonas sexuales pueden tener efectos en las neuronas, que son independientes de los receptores intracelulares clásicos. Así, pueden activar vías de señalización intracelular y modificar la concentración de calcio intracelular en las neuronas, igual que lo hacen en las células de glía, como antes se ha mencionado. Se ha descrito la existencia de receptores de membrana para el estradiol en las neuronas, que están asociados a los receptores metabotrópicos de glutamato y pueden ser responsables de los efectos rápidos del estradiol sobre la función neuronal (16-18). Por otra parte los receptores intracelulares clásicos pueden estar asociados a la caveolina 1 en la membrana celular de las neuronas e interactuar con las vías de señalización de otros factores, tales como el IGF-1, el factor de crecimiento nervioso (NGF) o el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (19,20). También, como ya se ha mencionado, los metabolitos de la progesterona, en particular la tetrahidroprogesterona, pueden modular la actividad de los receptores para neurotransmisores.

En las sinapsis, las hormonas sexuales regulan la síntesis y liberación de neurotransmisores, así como la síntesis de los receptores de neurotransmisores, su localización en la membrana postsináptica, la actividad de estos receptores, la recaptación de los neurotransmisores por el terminal presináptico e incluso el número de contactos sinápticos entre las neuronas. De esta manera las hormonas sexuales regulan la transmisión de información entre las neuronas. Entre las sinapsis reguladas por las hormonas sexuales se encuentran las GABAérgicas y las glutamatérgicas, es decir los dos principales tipos de sinapsis inhibidoras y excitadoras, respectivamente. Además regulan la transmisión sináptica domapinérgica, que está involucrada en los circuitos de refuerzo y motivación y en circuitos de control motor, siendo en neurotransmisor producido por las neuronas de la sustancia nigra que inervan el estriado. Las hormonas sexuales, en particular el estradiol y la progesterona, regulan el circuito nigro-estriatal, lo cual tiene consecuencias para la enfermedad de Parkinson y las disquinesias, como

veremos más adelante. Otro tipo de sinapsis reguladas por las hormonas sexuales son las serotoninérgicas, con lo cual, las hormonas sexuales también afectan el estado de ánimo. De hecho, el estradiol y la progesterona tienen claros efectos antidepresivos y sus acciones están en parte mediadas por el control de la función de las sinapsis serotoninérgicas.

Además de regular la función de las sinapsis, las hormonas sexuales regulan fenómenos de plasticidad cerebral, favoreciendo modificaciones en el número de conexiones entre las neuronas y en el funcionamiento de las sinapsis a largo plazo (fenómenos conocidos como potenciación sináptica a largo plazo o LTP y depresión sináptica a largo plazo, o LTD). La regulación de la plasticidad sináptica por las hormonas sexuales se ha detectado en numerosas regiones cerebrales, incluyendo los circuitos hipotalámicos involucrados en la regulación de la secreción neuroendocrina, las motoneuronas de la médula espinal o en ciertas neuronas de la corteza cerebral y del hipocampo (21,22). Las hormonas sexuales regulan el número y la función de las sinapsis excitatorias sobre las espinas dendríticas y el número y función de las sinapsis inhibitorias sobre el soma neuronal, regulando así la excitabilidad neuronal y la probabilidad de que una neurona determinada genere o no un potencial de acción. Esta regulación hormonal se ejerce a largo plazo (minutos, horas o días) superponiéndose así a la rápida regulación de la transmisión sináptica ejercida por los neurotransmisores en la escala de milisegundos. La regulación de la actividad de las sinapsis excitatorias e inhibitorias por las hormonas sexuales participa en el control fisiológico de la función cerebral, pero también tiene repercusiones clínicas. Así, por ejemplo, en pacientes con epilepsia el estradiol actúa como un agente proconvulsivante al aumentar la actividad de las sinapsis excitadoras y la progesterona como anticonvulsivante. En consecuencia la frecuencia de crisis epilépticas puede verse afectada por las fases del ciclo menstrual (epilepsia catamenial) siendo lo más frecuente un aumento de crisis en el periodo perimenstrual. Las mujeres que sufren epilepsia catamenial pueden tener también un aumento en la frecuencia de crisis durante la perimenopausia, pero es frecuente una disminución después de la menopausia. Estas acciones del estradiol y la progesterona tienen implicaciones para el uso de anticonceptivos hormonales en este tipo de pacientes y debe ser tenido en cuenta a la hora de prescribir terapia hormonal a las mujeres que padecen esta enfermedad (23).

Muchas neuronas del cerebro humano expresan la enzima aromatasa y son, por lo tanto, capaces de producir estradiol a partir de testosterona y otros andrógenos precursores. En la corteza cerebral y el hipocampo la mayor parte de las neuronas que expresan aromatasa son de tipo piramidal (24). Algunas interneuro-

nas inhibitorias también la expresan. Los estudios realizados en animales han demostrado que la actividad sináptica, en particular la actividad excitatoria, es capaz de regular rápidamente la actividad de la enzima aromatasa y por lo tanto la producción local de estradiol. El estradiol así producido es capaz de modificar a su vez la actividad de las sinapsis y regular las respuestas funcionales de los circuitos neuronales, incluyendo las respuestas comportamentales y afectivas (8).

ACCIONES NEUROPROTECTORAS DE LAS HORMONAS OVÁRICAS EN MODELOS ANIMALES

Además de regular la función sináptica, las hormonas ováricas ejercen efectos neuroprotectores sobre las neuronas, a través de diversos mecanismos directos o por la mediación de otros tipos celulares del sistema nervioso (12,15,25,26). Los efectos neuroprotectores y neurorregeneradores de la progesterona han sido bien caracterizados en modelos experimentales de degeneración del nervio periférico tras lesión. Se ha demostrado que la progesterona tiene un efecto beneficioso para el tratamiento de la neuropatía periférica y, de hecho, el tratamiento con la hormona es capaz de modular la expresión de las proteínas de mielina y prevenir así las alteraciones estructurales y funcionales causadas por la diabetes experimental o por el envejecimiento del nervio ciático de las ratas. Además de los efectos protectores sobre el nervio periférico, la progesterona también tiene efectos neuroprotectores y neurorreparadores en el SNC, caracterizados en diversos modelos de neurodegeneración del cerebro o la médula espinal. Entre estos se incluyen la degeneración del hipocampo inducida por la administración de colchicina, la muerte neuronal por excitotoxicidad en el cerebro y la médula espinal, la lesión traumática cerebral y medular, la isquemia cerebral, el Parkinson experimental, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) experimental, la axotomía de las motoneuronas y la encefalomielitis autoinmune experimental.

Son aun más numerosos los estudios que han demostrado la capacidad del estradiol de disminuir la muerte neuronal inducida por una gran variedad de alteraciones, incluyendo la excitotoxicidad, una causa común de muerte neuronal en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas. También previene la muerte neuronal causada por fenómenos de oxidación celular, que pueden ser muy relevantes, tanto en la enfermedad de Alzheimer, como en la enfermedad de Parkinson (Fig. 1). De hecho, el estradiol es neuroprotector en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson. La hormona ejerce una regulación del sistema nigroestriatal dopaminérgico y aumenta los niveles de dopamina en el estriado, en condiciones fisiológicas. Además la terapia con estradiol previene

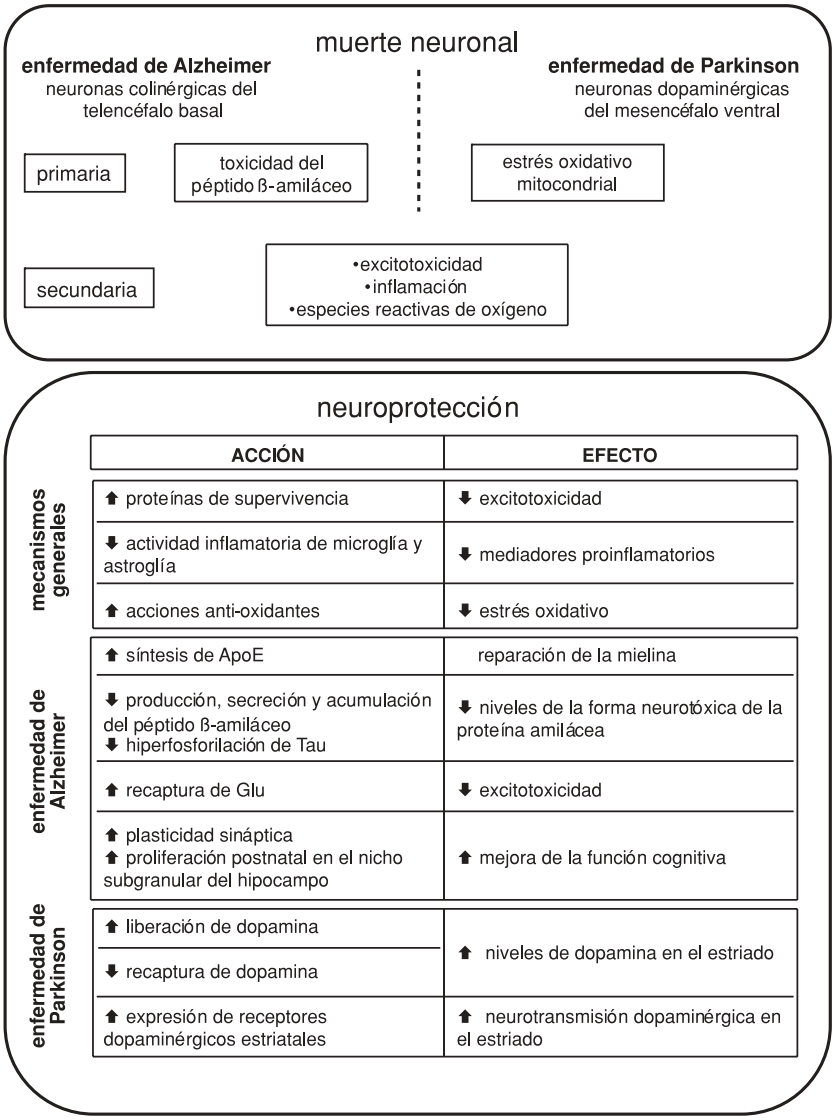


Figura 1. *Resumen de los mecanismos de neuroproteción activados por el estradiol en situaciones patológicas, en base a los datos obtenidos, tanto en la clínica, como en la experimentación con modelos animales de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson.* **A**, *Además de la muerte de neuronas específicamente afectadas (muerte primaria), se produce también una muerte celular secundaria, local y resultante de la destrucción primaria de las neuronas. Dicha muerte secundaria se produce en toda situación neuropatológica.* **B**, *El estradiol activa mecanismos neuroprotectores generales, que operan en cualquier tipo de situación patológica, así como mecanismos particulares en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, que no sólo inciden en la supervivencia neuronal, sino también en la actividad nerviosa.*

la bajada en los niveles de dopamina en el estriado en roedores y monos causada por el tratamiento con toxinas que provocan la muerte de las neuronas dopaminergicas de la sustancia negra (Fig. 1). El estradiol previene la muerte de estas neuronas en roedores tratados con 6-hidroxidopamina o MPTP y también reduce las disquinesias causadas por la administración de MPTP en monos. Además de prevenir la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, el estradiol protege la función del sistema nigroestriatal aumentando la liberación de dopamina, inhibiendo su recaptura y regulando la expresión de los receptores de dopamina en el estriado (Fig. 1) (27,28).

Respecto a la enfermedad de Alzheimer, los estudios experimentales sugieren que el estradiol puede ejercer efectos terapéuticos sobre algunos aspectos de la patología. El estradiol aumenta la función de las neuronas colinérgicas basales del cerebro anterior y disminuye la hiperfosoforilación de Tau, característica de la enfermedad de Alzheimer (Fig. 1). Además, el estradiol protege a las neuronas frente a la toxicidad del péptido β-amiláceo, disminuye la generación y secreción de la misma, así como la acumulación de la proteína precursora en el estriado, en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer (Fig. 1). Sin embargo, la hormona no es capaz de disminuir la acumulación de la proteína precursora amilácea, ni los depósitos del péptido β amiláceo en el hipocampo y la corteza, en modelos animales de esta enfermedad.

MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DE NEURPROTECCIÓN POR LA PROGESTERONA Y EL ESTRADIOL

Los mecanismos involucrados en las acciones neuroprotectoras de la progesterona no están todavía completamente aclarados (13,15,29-32). Sin embargo se sabe que la progesterona tiene propiedades antioxidantes, provoca la activación de las vías intracelulares de señalización que favorecen la supervivencia neuronal, promueve la expresión de factores tróficos, tales como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) e incrementa la expresión de moléculas antiapoptóticas, tales como las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L, reduciendo a la par la expresión de las proteínas proapoptóticas Bax, Bad y caspasa-3.

Las células de glía pueden participar en los efectos neuroprotectores de la progesterona. Estas células expresan los receptores de progesterona y la lesión cerebral induce la expresión por los astrocitos de la proteína de unión de la progesterona, denominada 25 Dx, y que está asociada a la membrana celular. La progesterona reduce la astrogliosis reactiva y la expresión de acuoporina 4 en los astrocitos tras una lesión cerebral y disminuye el edema cerebral, actuando

sobre los astrocitos. La progesterona también puede ejercer efectos neurorpotectores a través de la modulación de la actividad proinflamatoria de la microglía. Además, la progesterona aumenta la densidad de progenitores de los oligodendrocitos en la medula espinal lesionada, la proliferación de los precursores de los oligodendrocitos en cultivos organotípicos del cerebelo, así como la ramificación de las prolongaciones de dichos precursores. Por otra parte, la hormona promueve la mielinización, la remielinización y la expresión de proteínas de mielina en el SNC.

Algunos de los efectos neuroprotectores de la progesterona pueden estar mediados por la activación de los receptores clásicos de la hormona, los cuales se expresan en abundancia en el cerebro y en la medula espinal. Sin embargo, la hormona también puede proteger a través de la activación de recursos independientes de los receptores de progesterona clásicos, como son los receptores de membrana o la proteína 25 Dx antes aludida. Además, los metabolitos reducidos de la progesterona, tales como la tetrahidroprogesterona, pueden ejercer efectos rápidos en la membrana celular, modulando los receptores $GABA_A$. Tal y como se ha indicado anteriormente, en el SNC, la progesterona se metaboliza rápidamente en dihidroprogesterona, la cual se convierte a su vez en tetrahidroprogesterona. Estas conversiones están catalizadas por las enzimas 5α-reductasa y 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, respectivamente. Esta última enzima puede, o bien reducir la dihidroprogesterona en tetrahidroprogesterona, o bien oxidar la tetrahidroprogesterona, dando dihidroprogesterona. Se ha observado, que la regulación endógena de la producción de dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona en la medula espinal, participa en el control de la comunicación de los circuitos nociceptivos y en el control de diferentes funciones cerebrales, como el comportamiento. El metabolismo local de la progesterona en el cerebro también tiene una función neuroprotectora, promoviendo la disminución de la gliosis reactiva y la supervivencia neuronal en diversas situaciones neurodegenerativas. Además, la inhibición farmacológica del metabolismo de la progesterona bloquea los efectos neuroprotectores de la hormona (29). Por ejemplo, la administración del inhibidor de la 5α-reductasa, el finasteride, previene los aumentos de los niveles de dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona observados en el plasma y el cerebro de ratas ovariectomizadas, que han recibido una inyección de progesterona. También previene los efectos neuroprotectores de la progesterona en el cerebro de ratas ovariectomizadas inyectadas con ácido kaínico, una toxina que provoca muerte neuronal por excitotoxicidad en el hipocampo. Además, el inhibidor de la 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, la indometacina, bloquea los efectos neuroprotectores y anti-glióticos de la dihidroprogesterona, así como los de la tetrahidroprogesterona, lo que sugiere que

ambos metabolitos son necesarios para que se produzcan los efectos neuroprotectores de la progesterona. La dihidroprogesterona y la tetrahidroprogesterona pueden ejercer efectos complementarios que contribuyen a la neuroprotección. La dihidroprogesterona, que es neuroprotectora a concentraciones bajas, actúa a través de los receptores de progesterona y puede promover la transcripción de genes neuroprotectores, mientras que la tetrahidroprogesterona, que es neuroprotectora en concentraciones relativamente altas, actúa como un agonista alostérico de los receptores $GABA_A$. La enzima 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa puede regular los niveles óptimos de estos dos metabolitos de la progesterona en el cerebro (29).

El papel del metabolismo de la progesterona en las acciones neuroprotectoras de la hormona es muy relevante para comprender los efectos sobre el cerebro de la terapia hormonal que utiliza progestágenos sintéticos. Por ejemplo, en contraste con los efectos neuroprotectores de la progesterona natural, el acetato de medroxiprogesterona (MPA, Provera), utilizado en terapia hormonal en mujeres postmenopáusicas y en estudios clínicos como el *Women's Health Initiative* (WHI) auspiciado por el *National Institutes of Health* de E.E.U.U. (NIH), es incapaz de prevenir la gliosis y la muerte neuronal en el hipocampo de animales inyectados con ácido kaínico, un análogo del glutamato que, como ya se ha mencionado, produce muerte por excitotoxicidad (29). Además, mientras que la progesterona y el estradiol protegen a las neuronas del hipocampo en cultivo frente a la toxicidad por glutamato, la medroxiprogesterona no solamente no es neuroprotectora en este modelo, sino que además, bloquea los efectos neuroprotectores del estradiol y la sobreexpresión inducida por el estradiol de los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Por otra parte, tanto el estradiol, como la progesterona elevan los niveles intraneuronales de calcio debidos al glutamato, mientras que la medroxiprogesterona bloquea los efectos del estradiol. También se ha observado que la medroxiprogesterona disminuye el efecto neuroprotector ejercido por los estrógenos conjugados orales en infartos cerebrales experimentales en la rata. El diferente metabolismo de la progesterona y la medroxiprogesterona puede ser, entre otras, una de las causas de sus diferentes efectos sobre el cerebro, puesto que la administración de progesterona aumenta de una manera muy significativa los niveles de dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona en el cerebro, mientras que la medroxiprogesterona no tiene efectos sobre los niveles cerebrales de estos metabolitos. Además, la medroxiprogesterona es un inhibidor de la enzima 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, la responsable de la conversión reversible entre la dihidroprogesterona y la tetrahidroprogesterona. Por lo tanto, la medroxiprogesterona puede prevenir las acciones neuroprotectoras de la dihidroprogesterona y la tetrahidroprogesterona en

el cerebro. Por último, no se puede descartar que la progesterona y la medroxiprogesterona produzcan diferentes efectos en otras moléculas implicadas en la supervivencia neuronal, como son los receptores de andrógenos y los de glucocorticoides (29).

Los mecanismos neuroprotectores del estradiol están muy bien documentados (12). El estradiol promueve la reinervación colateral de circuitos deaferentados y acelera la regeneración de los axones lesionados, regulando la expresión y la actividad de una gran variedad de moléculas que participan, tanto en los procesos de crecimiento axonal, como en los procesos de reconocimiento de sus dianas celulares por los axones y que incluyen componentes del citoesqueleto neuronal y glial, moléculas de adhesión celular implicadas en la guía axonal y moléculas solubles como los factores tróficos y las neurotrofinas. El estradiol induce la expresión en los axones de la proteína asociada a los microtúbulos Tau, además de regular su fosforilación en el cerebro, lo cual facilita la estabilización de los microtúbulos y el crecimiento axonal. Otra molécula que puede estar involucrada en los efectos del estradiol en la regeneración axonal es la GAP-43, proteína presináptica implicada en el crecimiento y la regeneración de los axones y cuya expresión está modulada por el estradiol en diversas regiones cerebrales. La apolipoproteína E (ApoE) también puede participar en el efecto del estradiol sobre el crecimiento axonal colateral en circuitos deaferentados. La ApoE está involucrada en el metabolismo del colesterol y de los lípidos y en la movilización y reutilización de los lípidos en la reparación, crecimiento y mantenimiento de las membranas de la mielina y las membranas de los axones después de una lesión cerebral. Además, el alelo epsilon 4 de la ApoE tiene un impacto directo sobre la función colinérgica en la enfermedad de Alzheimer y es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurológicas crónicas asociadas al envejecimiento. La síntesis de ApoE se reduce de una manera muy notable tras las lesiones de los nervios periféricos y las lesiones del SNC. En consonancia con esto, los animales deficientes en ApoE presentan un mayor daño cerebral tras un infarto cerebral y tras otras formas de lesión cerebral, lo que sugiere que la ApoE es un factor involucrado en la reparación cerebral. En este sentido es interesante reseñar que el estradiol aumenta la expresión de ApoE en los astrocitos y en la microglía y que la hormona induce el crecimiento colateral de los axones en respuesta a una lesión de la corteza cerebral, en los ratones normales, pero no en los que son deficientes en ApoE. Por lo tanto, la ApoE está involucrada en las acciones neuroprotectoras del estradiol, manifestadas por la inducción del crecimiento y regeneración axonal (Fig. 1). Además, los diferentes alelos de la ApoE pueden incidir diferencialmente en las acciones neuroprotectoras y neuroplásticas del estradiol. Por ejemplo, los efectos anti-in-

flamatorios de la hormona están disminuidos en ratones que tienen el genotipo ApoE4, comparados a los ratones con el genotipo ApoE3 y el resultado neuroprotector de la terapia con estrógenos en las mujeres postmenopáusicas parece estar determinado por las diferentes combinaciones alélicas (33).

Tal y como se ha comentado en el caso de la progesterona, las acciones neuroprotectoras del estradiol implican la regulación de la expresión de moléculas implicadas en el control de la muerte celular (12). El estradiol aumenta la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL en las neuronas y esta acción hormonal está asociada a un aumento de la supervivencia neuronal en diversos modelos de neurodegeneración, incluyendo la toxicidad por el péptido β amiláceo y el Parkinson experimental (Fig. 1).

Otra acción importante del estradiol sobre el remodelado del tejido cerebral en condiciones neurodegenerativas, es la regulación de las modificaciones plásticas de las células de glía (6,9). La acción del estradiol sobre la astroglía es diferente dependiendo de que la hormona esté actuando en condiciones fisiológicas o en condiciones de daño cerebral. En condiciones fisiológicas el estradiol aumenta la expresión de la GFAP y promueve la extensión de prolongaciones celulares inmunoreactivas para esta proteína. Por el contrario, en condiciones de daño cerebral en las que se produce una activación de los astrocitos para formar la astroglía reactiva, el estradiol disminuye la expresión de la GFAP y de la vimentina, su proliferación y reduce la cicatriz glial (6). Por otra parte, los astrocitos pueden mediar las acciones neuroprotectoras del estradiol mediante la liberación, en respuesta a la hormona, de factores tróficos para las neuronas. El estradiol también aumenta la recaptación de glutamato en astrocitos obtenidos de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Fig. 1), lo cual puede contribuir a la acción protectora de la hormona en esta enfermedad, en la que los niveles extracelulares de glutamato están aumentados, haciendo que sea neurotóxico. Por otra parte, el estradiol regula la expresión de la proteína acuaporina -4 en los astrocitos, con lo que reduce el edema cerebral. El estradiol también disminuye la inflamación cerebral actuando sobre los astrocitos, a base de reducir la activación del factor nuclear κB, que se induce por el péptido β amiláceo 1-40 y por otros estímulos pro-inflamatorios. Puesto que el factor nuclear κB es un potente regulador transcripcional de genes pro-inflamatorios la regulación hormonal de esta molécula en los astrocitos puede jugar un papel esencial en los efectos neuroprotectores de la hormona (6,12,13).

El estradiol también ejerce acciones anti-inflamatorias en el cerebro actuando sobre la microglía (6,34), a base de reducir la producción de oxido nítrico y la expresión de diversos mediadores pro-inflamatorios en estas células.

También reduce el número de las células de microglía que se activan como consecuencia de la acción de estímulos pro-inflamatorios en el cerebro y del daño neuronal neurodegenerativo. El estradiol además es capaz de aumentar la captura de péptido β amiláceo por la microglía de la corteza cerebral humana, lo cual es muy relevante para los efectos protectores de la hormona frente a la enfermedad de Alzheimer. En un modelo animal de esta enfermedad, los ratones APP23, el estradiol reduce la activación de la microglía alrededor de las placas de péptido β amiláceo y disminuye la deposición de este péptido (34) (Fig. 1).

Las acciones neuroprotectoras del estradiol pueden ser ejercidas, al menos en parte, a través de la activación de los receptores clásicos de estrógeno en el cerebro, puesto que el bloqueo farmacológico o génico de estos receptores inhibe las acciones neuroprotectoras de la hormona. Tanto los receptores de estrógeno de tipo α como los de tipo β parecen estar implicados en las acciones neuroprotectoras de la hormona (35). Por ejemplo, los ratones deficientes para el receptor de estrógeno α presentan una mayor disminución en los niveles de dopamina en el estriado tras la lesión de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson. Además, las acciones protectoras del estradiol frente a la pérdida de terminales dopaminérgicos en el estriado en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson se previenen, tanto en los ratones deficientes para el receptor α, como en los ratones deficientes para el receptor β, lo que indica que ambos tipos de receptores están involucrados en los mecanismos neuroprotectores del estradiol frente a la neurodegeneración asociada a esta enfermedad.

No obstante, algunas de las acciones neuroprotectoras del estradiol pueden ser independientes de la activación de receptores específicos, ya que los estrógenos tienen propiedades antioxidantes (Fig. 1) y disminuyen el estrés oxidativo en las neuronas. La actividad anti-oxidante de los estrógenos depende del grupo hidroxilo en la posición del carbono 3 en el anillo A de la molécula. Además de sus acciones anti-oxidantes, el estradiol también puede activar otros mecanismos de neuroprotección que son independientes de la regulación transcripcional mediada por los receptores de estrógeno clásicos. Así, se ha detectado que el estradiol puede tener efectos rápidos en la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión, afectando la activación de cascadas rápidas de señalización intracelular en las neuronas y en las células de glía. Estas acciones pueden estar mediadas por receptores de membrana o receptores clásicos transitoriamente asociados a las membranas celulares y que pueden interactuar con las vías de señalización intracelular de otros factores, incluyendo las vías de señalización de factores tróficos como el factor de crecimiento similar a insulina-I (IGF-I) y neurotrofinas como el factor de cre-

cimiento nervioso (NGF) y el BDNF. Así, por ejemplo, el efecto neuroprotector del estradiol en modelos animales de enfermedad de Parkinson está asociado a un aumento en la activación de las vías de señalización del IGF-I, de forma que el bloqueo de los receptores de IGF-I, previene los efectos neuroprotectores del estradiol en estos modelos y frente a la muerte neuronal por excitotoxicidad (36,37). Además el estradiol y el IGF-I tienen un efecto sinérgico en la expresión de la proteína Bcl-2, por sus acciones conjuntas a través de la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K). Esta vía también regula la actividad de la glucógeno sintasa kinasa 3 β (GSK3β), que juega un papel clave en la regulación de la fosforilación de Tau y en la superviencia neuronal. En condiciones patológicas, como la enfermedad de Alzheimer, la GSK3β puede ser responsable de la hiperfosforilación de Tau y su inhibición está asociada a la activación de las vías de señalización de supervivencia neuronal. El estradiol regula la actividad de la GSK3β, inhibiéndola a largo plazo y disminuyendo la fosforilación de Tau y promoviendo la supervivencia neuronal (36).

Finalmente debemos mencionar la importancia de la síntesis local de estradiol por el cerebro en la respuesta a la neurodegeneración. Como ya se ha mencionado, la actividad de la enzima aromatasa cerebral está involucrada en la regulación de la función y plasticidad sináptica en condiciones fisiológicas. Además, cuando se produce un fenómeno neurodegenerativo, se induce la expresión de aromatasa por los astrocitos reactivos y esta expresión tiene una acción neuroprotectora (38). Si se inhibe la actividad de la enzima y por consiguiente la producción local de estradiol en el cerebro en un animal con una enfermedad neurodegenerativa, el daño resultante es mucho mayor. Por lo tanto, la regulación de la expresión y actividad de la enzima aromatasa en el cerebro, puede representar una nueva diana terapéutica para la prevención de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson. En este sentido es importante notar que los niveles de estradiol están disminuidos en el líquido cefalorraquídeo de mujeres con enfermedad de Alzheimer, y también se ha observado que la expresión de la enzima aromatasa puede estar reducida en el cerebro de estas pacientes. También se ha propuesto que una disminución en los niveles cerebrales de la enzima puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (39).

ESTUDIOS CLÍNICOS

En claro contraste con los datos experimentales, los datos clínicos sobre las acciones neuroprotectoras del estradiol contra la neurodegeneración asociada a las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson son contradictorios (40-49). En varios

estudios clínicos se ha analizado el efecto de las terapias hormonales con estrógenos y progestinas (HT) o con estrógenos solamente (ET) sobre la función cerebral. Se ha demostrado que la terapia hormonal en mujeres postmenopáusicas está asociada a un aumento en el volumen del hipocampo y la mayor parte de los estudios sugieren que la terapia hormonal aumenta la capacidad de memoria y mejora la función cognitiva en mujeres sanas. Por ejemplo en el *Baltimore Longitudinal Study of Aging*, las mujeres sin trastornos cognitivos que recibieron HT ejecutaron mejor las tareas en pruebas de memoria visual y verbal que las mujeres que nunca recibieron terapia hormonal. Ambos grupos de mujeres eran comparables con respecto al nivel educativo, las condiciones generales de salud y de capacidad verbal. Además, la ET de corta duración ha mostrado ser capaz de mejorar las funciones cognitivas asociadas a la corteza prefrontal en las mujeres postmenopáusicas. La HT también es un tratamiento eficaz para la depresión en las mujeres perimenopáusicas y puede reducir algunos síntomas de la esquizofrenia en este grupo de mujeres. Algunos estudios también sugieren que el estrógeno puede reducir las alteraciones motoras asociadas a la enfermedad de Parkinson en mujeres. Igualmente, hay estudios observacionales que sugieren que la ET puede prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad de Alzheimer y algunos estudios clínicos randomizados indican que el estradiol puede disminuir el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, en otros estudios clínicos no se encuentra ningun efecto protector de la ET o la HT en la enfermedad de Parkinson y en algunos estudios clínicos randomizados no se observa una correlación entre la terapia hormonal y la magnitud del deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer. Incluso, algunos estudios sugieren que la terapia hormonal puede tener un impacto negativo en la capacidad cognitiva de mujeres que ya han desarrollado esta enfermedad y puede suponer un factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson. Además, de los resultados del estudio clínico randomizado WHI del NIH, en el que las participantes recibieron una tableta diaria de 0,625 mg de estrógenos equinos conjugados y 2,5 mg de MPA, o placebo, se puede inferir que hay un aumento en el riesgo de desarrollar algún tipo de demencia, como consecuencia de recibir un tratamiento hormonal prolongado e iniciado varios años después de la menopausia.

Por lo tanto hay una discrepancia aparente entre las potentes y consistentes acciones neuroprotectoras de las hormonas sexuales que han sido identificadas en los estudios en modelos animales y la alta variabilidad de los resultados de los estudios clínicos. Lógicamente, surge la interrogante sobre la causa de estas aparentes discrepancias. Una fuente potencial de variabilidad en los datos de los estudios clínicos son las considerables diferencias en la composición hormonal, la dosis, la ruta de administración, el tiempo de tratamiento y el tamaño mues-

tral entre los distintos estudios. Por ejemplo, la administración de una mezcla de estrógenos equinos puede tener efectos muy diferentes sobre el cerebro que la administración de 17β-estradiol solamente. También los diferentes progestágenos pueden tener muy distintos efectos en el cerebro. Por ejemplo, como ya se ha mencionado antes en este capítulo, el acetato de medroxiprogesterona utilizado en el estudio WHI tiene efectos en el cerebro muy diferentes a los de la progesterona natural. Ya hemos indicado que en los experimentos con animales se ha demostrado que la administración sistémica de progesterona aumenta los niveles de sus metabolitos dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona en el cerebro. Por el contrario, la administración de acetato de medroxiprogesterona no lo hace (29). Esta diferencia puede ser muy importante, ya que, al menos parte de las acciones neuroprotectoras de la progesterona, parecen depender de sus metabolitos y a diferencia de la progesterona natural, la medroxiprogesterona no es neuroprotectora en modelos animales de neurodegeneración e incluso puede bloquear los efectos neuroprotectores del estradiol. No se puede excluir por lo tanto que la progesterona natural, siendo capaz de metabolizarse en dihidroprogesterona y tetrahidroprogesterona, pueda tener unos mejores efectos pro-cognitivos en el cerebro humano que la medroxiprogesterona y puede en parte explicar los resultados del estudio WHI. No obstante, el estudio WHI tampoco detectó el esperado efecto neuroprotector de los estrógenos en el grupo de mujeres que solo recibieron estrógenos equinos conjugados (0,625 mg/día) por vía oral. Por lo tanto, las discrepancias entre diversos estudios no pueden explicarse únicamente por el uso de diferentes progestágenos.

Otro parámetro que puede ser altamente relevante para explicar los diferentes resultados entre distintos estudios clínicos es la edad de las mujeres en el momento de iniciación de la terapia hormonal. Este parámetro también está relacionado con la duración de la privación de hormonas ováricas antes de iniciar la terapia. Hay que tener en cuenta que los resultados del estudio WHI son relevantes para una terapia hormonal de larga duración que se inicia en mujeres de 65 años o más y no es predictivo de los efectos de una terapia hormonal de corta duración iniciada en el periodo perimenopáusico. El foco del estudio WHI sobre mujeres que iniciaron el tratamiento hormonal varios años después de la iniciación del climaterio, es una limitación muy importante, puesto que hay numerosas razones para pensar que la transición perimenopáusica es un periodo crítico para la eficacia de la terapia hormonal en la prevención de alteraciones cerebrales. De hecho, la mayoría de los estudios clínicos que han analizado los efectos sobre la función cognitiva de la terapia hormonal iniciada durante el periodo perimenopáusico han encontrado una acción significativa y positiva. Es posible que durante este periodo crítico el cerebro se esté adaptando a los cambios

en los niveles hormonales y que por ello sea más eficaz la terapia en ese momento. Por otra parte, en estudios en animales se ha demostrado que los estrógenos pierden capacidad neuroprotectora y anti-inflamatoria en el cerebro, tras un periodo largo de privación hormonal. Por lo tanto, la duración de la privación hormonal previa afecta a la respuesta del cerebro a la acción del estradiol. Estos resultados son importantes para explicar la discrepancia entre los estudios en animales y el estudio WHI y entre los resultados del estudio WHI y otros estudios clínicos, puesto que en el estudio WHI la mayoría de las mujeres iniciaron el tratamiento tras un periodo de varios años de privación de hormonas ováricas. Todo esto ha llevado a sugerir que existe una ventana de oportunidad terapéutica para las acciones protectoras de la ET y la HT en el cerebro y que esta ventana se sitúa en el periodo perimenopáusico (50). Finalmente hay que considerar que lo que los estudios en modelos animales han demostrado mayoritariamente, es un efecto preventivo del estradiol y la progesterona para el desarrollo de patologías experimentales equivalentes a las enfermedades de Parkinson y Alzheimer y no está claro cual puede ser el efecto de estas hormonas en un cerebro que ya está sometido a un proceso degenerativo. No hay que descartar que los efectos reparadores de las hormonas sexuales al ser ejercidos sobre circuitos neuronales dañados puedan empeorar aun más su funcionalidad en lugar de mejorarla.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Blaustein, J.D. (2008) Progesterone and progestin receptors in the brain: the neglected ones. *Endocrinology* 149: 2737-8.

(2) Brinton, R.D. *et al*. (2008) Progesterone receptors: form and function in brain. *Front. Neuroendocrinol*. 29: 313-39.

(3) Morissette, M. *et al*. (2008) Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 108: 327-38.

(4) Ardelt, A.A. *et al*. (2005) Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor-alpha in a rodent experimental stroke model. *Stroke* 36: 337-41.

(5) Krause, D.N., Duckles, S.P., Pelligrino D.A. (2006) Influence of sex steroid hormones on cerebrovascular function. *J. Appl. Physiol*. 101: 1252-61.

(6) Garcia-Segura, L.M., Melcangi, R.C. (2006) Steroids and glial cell function. *Glia* 54: 485-98.

(7) Pozzi, S., *et al*. (2006) Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1089: 302-23.

(8) García-Segura, L.M. (2008) Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J. Neuroendocrinol.* 20: 705-12.

(9) García-Ovejero, D., *et al.* (2005) Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res. Rev.* 48: 273-86.

(10) Micevych, P., Sinchak, K. (2008) Synthesis and function of hypothalamic neuroprogesterone in reproduction. *Endocrinology* 149: 2739-42.

(11) García-Segura, L.M., Lorenz, B., Don Carlos, L.L. (2008) The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction* 135: 419-29.

(12) Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., Don Carlos, L.L. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.* 63: 29-60.

(13) Stein, D.G. (2008) Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Res. Rev.* 57: 386-97.

(14) Melcangi, R.C., Garcia-Segura, L.M. (2006) Therapeutic approaches to peripheral neuropathy based on neuroactive steroids. *Expert Rev. Neurother.* 6: 1121-5.

(15) De Nicola, A.F. *et al.* (2006) Progesterone treatment of spinal cord injury: Effects on receptors, neurotrophins, and myelination. *J. Mol. Neurosci.* 28: 3-15.

(16) Vasudevan ,N., Pfaff, D.W. (2008) Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Front. Neuroendocrinol.* 29: 238-57.

(17) Kelly, M.J., Rønnekleiv, O.K. (2008) Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons. *Mol. Cell. Endocrinol.* 290: 14-23.

(18) Micevych P.E., Mermelstein P.G. (2008) Membrane estrogen receptors acting through metabotropic glutamate receptors: an emerging mechanism of estrogen action in brain. *Mol. Neurobiol.* 38: 66-77.

(19) Etgen, A.M., González-Flores, O., Todd, B.J. (2006) The role of insulin-like growth factor-I and growth factor-associated signal transduction pathways in estradiol and progesterone facilitation of female reproductive behaviors. *Front. Neuroendocrinol.* 27: 363-75.

(20) Mendez, P., Wandosell, F., Garcia-Segura, L.M. (2006) Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.* 27: 391-403.

(21) Naftolin, F. *et al.* (2007) Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reprod. Sci.* 14: 101-16.

(22) Spencer, J.L. *et al.* (2008) Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front. Neuroendocrinol.* 29: 219-37.

(23) Scharfman, H.E., MacLusky, N.J. (2006) The influence of gonadal hormones on neuronal excitability, seizures, and epilepsy in the female. *Epilepsia* 47: 1423-40.

(24) Yague, J.G. *et al*. (2006) Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience* 138: 389-401.

(25) Simpkins, J.W., Dykens, J.A. (2008) Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res. Rev.* 57: 421-30.

(26) Suzuki, S., Brown, C.M., Wise, P.M. (2006) Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 29: 209-15.

(27) Morissette. M., *et al*. (2008) Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease. *Mol. Cell. Endocrinol*. 290: 60-9.

(28) Sawada, H., Shimohama, S. (2003) Estrogens and Parkinson disease: novel approach for neuroprotection. *Endocrine* 21: 77-9.

(29) Ciriza, I. *et al*. (2006) Reduced metabolites mediate neuroprotective effects of progesterone in the adult rat hippocampus. The synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (Provera) is not neuroprotective. *J. Neurobiol*. 66: 916-28.

(30) Bourque, M., Dluzen, D.E., Di Paolo, T. (2009) Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front. Neuroendocrinol*. 30: 142-57.

(31) De Nicola, A.F. *et al*. (2009) Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Front. Neuroendocrinol*. 30: 173-87.

(32) Schumacher, M., Guennoun, R., Stein, D.G., De Nicola, A.F. (2007) Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. *Pharmacol. Ther.* 116: 77-106.

(33) Struble, R.G., Cady, C., Nathan, B.P., McAsey, M. (2008) Apolipoprotein E may be a critical factor in hormone therapy neuroprotection. *Front. Biosci*. 13: 5387-405.

(34) Vegeto, E., Benedusi, V., Maggi, A. (2008) Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front. Neuroendocrinol*. 29: 507-19.

(35) Morissette, M. *et al*. (2008) Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 108: 327-38.

(36) Mendez, P., Wandosell, F., Garcia-Segura, L.M. (2006) Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms. *Front. Neuroendocrinol*. 27: 391-403.

(37) Quesada, A., Lee, B.Y., Micevych, P.E. (2008) PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev. Neurobiol*. 68: 632-44.

(38) Garcia-Segura, L.M. *et al*. (2003) Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog. Neurobiol*. 71: 31-41.

(39) Morale, M.C. *et al*. (2008) Loss of aromatase cytochrome P450 function as a risk factor for Parkinson's disease? *Brain Res. Rev.* 57: 431-43.

(40) Cyr, M., *et al*. (2002) Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J. Psychiatry Neurosci*. 27: 12-27.

(41) Dluzen, D., Horstink, M. (2003) Estrogen as neuroprotectant of nigrostriatal dopaminergic system: laboratory and clinical studies. *Endocrine* 21: 67-75.

(42) Henderson, V.W. (2006) The neurology of menopause. *Neurologist* 12: 149-59.

(43) Henderson, V.W. (2007) Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Climacteric* 10 Suppl 2: 92-6.

(44) Henderson, V.W. (2008) Cognitive changes after menopause: influence of estrogen. *Clin. Obstet. Gynecol*. 51: 618-26.

(45) Liu, B., Dluzen, D.E. (2007) Oestrogen and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration: animal models and clinical reports of Parkinson's disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 34: 555-65.

(46) Nicoletti, A., *et al*. (2007) Hormonal replacement therapy in women with Parkinson disease and levodopa-induced dyskinesia: a crossover trial. *Clin. Neuropharmacol*. 30: 276-80.

(47) Popat, R.A. *et al*. (2005) Effect of reproductive factors and postmenopausal hormone use on the risk of Parkinson disease. *Neurology* 65: 383-90.

(48) Ragonese, P., D'Amelio, M., Savettieri, G. (2006) Implications for estrogens in Parkinson's disease: an epidemiological approach. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1089: 373-82.

(49) Saunders-Pullman, R. (2003) Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both? *Endocrine* 21: 81-7.

(50) Henderson, V.W. (2007) Cognition and cognitive aging. *Climacteric* 10 Suppl 2: 88-91.

4. GRKs y arrestinas en la regulación de receptores cerebrales

FEDERICO MAYOR MENÉNDEZ

Departamento de Biología Molecular y Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Universidad Autónoma de Madrid, c/ Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma, 28049 Madrid.

RESUMEN

Las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y las arrestinas representan un importante punto de convergencia de diferentes rutas de señalización. Estas proteínas fueron inicialmente identificadas como componentes críticos en la desensibilización e internalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), una familia de centenares de proteínas de membrana de gran importancia fisiológica y farmacológica. Datos más recientes indican que tanto GRKs como arrestinas pueden también desempeñar un papel en la propagación de señal, contribuyendo a ensamblar complejos multimoleculares en el entorno del receptor, actuando como proteínas adaptadoras que interaccionan con diversas proteínas implicadas en señalización celular. La utilización de modelos celulares y animales está aportando abundante información sobre el papel de estas proteínas en el control de las funciones del sistema nervioso, donde se encuentran abundantemente expresadas. El mejor conocimiento de las funciones de isoformas específicas de GRKs y arrestinas en la señalización de diversos receptores cerebrales permitirá definir su participación en procesos fisiopatológicos y su posible utilidad diagnóstica o terapéutica.

ABSTRACT

G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and arrestins represent an important point of convergence of different signalling routes. These proteins were in-

itially identified as central players in the desensitization and internalization of G protein-coupled receptors (GPCR), a family of hundreds of membrane proteins of key physiological and pharmacological importance. On top of that, recent data indicate that both GRKs and arrestins can also play a role in signal propagation by helping assemble macromolecular signalosomes in the receptor environment, acting as agonist-regulated scaffolds able to interact with a variety of proteins involved in cell signaling. The use of cellular and animal models is sheding new light about the role of GRKs and arrestins in the nervous systems, where these proteins are abundantly expressed. A better knowledge of the functional role of specific GRK and arrestins isoforms in the modulation and signaling of relevant brain receptors would allow to delineate its participation in physiopathological processes and to evaluate its potential use as diagnostic tools or therapeutic targets.

INTRODUCCIÓN

La familia de las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) es un grupo de siete serina/treonina quinasas en mamíferos, que específicamente reconocen y fosforilizan receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) activados, conduciendo a la desensibilización del receptor (1,2). La fosforilación del receptor mediada por GRKs provoca la unión de proteínas citosólicas denominadas arrestinas, que bloquean la capacidad de los GPCR de interactuar con proteínas G, conduciendo a una rápida desensibilización. Como resultado de la unión de β-arrestinas, los receptores fosforilados son el objeto de endocitosis mediada por clatrina, un proceso que finalmente re-sensibiliza y recicla los receptores a la membrana plasmática (3,4).

Los miembros de la familia GRK pueden ser subdivididos en tres grupos principales basados en homología de secuencias (2): la familia rodopsina quinasa o GRK visuales (GRK1 y GRK7), la subfamilia de la quinasa del receptor β-adrenérgico (GRK2/GRK3), y la subfamilia GRK4 (GRK4, GRK5 y GRK6). GRK2, 3, 5 y 6 están expresadas ubicuamente en los tejidos de los mamíferos. Todas ellas comparten una arquitectura de dominios funcionales similar, con un dominio catalítico central bien conservado, un dominio RH (Regulator of G protein signalling homology domain) en la región amino-terminal, y una zona C-terminal que contiene diversos determinantes para su interacción con la membrana plasmática.

En cuanto a las arrestinas, también existen dos tipos de arrestinas visuales, cuya expresión se restringe a las células de la retina, y otras dos isoformas somáticas, la beta-arrestina 1 (a veces denominada arrestina 2) y la beta-arrestina

2 (a veces anotada como arrestina 3) que se expresan en todos los tejidos (5, 6). Las beta-arrestinas sufren un notable cambio conformacional tras su unión al receptor activado, lo que, además de impedir la señalización del GPCR a la proteína G, permite el reclutamiento de la maquinaria de internalización, como clatrina o AP-2 (4, 6). Este fenómeno puede además ayudar a potenciar la activación de caminos de señalización adicionales, en los que las arrestinas actúan como adaptadores ("scaffolds") regulados por agonistas. En este aspecto, se ha mostrado que las β-arrestinas pueden reclutar diferentes moléculas señalizadoras, como c-Src, JNK-3, componentes de la cascada Raf/MEK/ERK, la fosfodiesterasa PDE4, el regulador del citoesqueleto Ral-GDS, componentes de la vía de señalización NFκB o la ubiquitina ligasa Mdm2, entre otros, al complejo del receptor (revisado en refs. 3 y 6). Por lo tanto, el reclutamiento de arrestinas mediado por GRK es fundamental para provocar la modulación de importantes cascadas de señalización intracelular por GPCR.

Por otra parte, datos recientes muestran que GRKs y arrestinas pueden también interactuar funcionalmente con otros tipos de receptores de membrana, como los receptores de PDGF o EGF con actividad tirosina-quinasa (7, 8, 9). Están siendo también identificados un número creciente de sustratos citoplásmicos de las GRKs (en particular de GRK2) (10, 11), así como interacciones funcionales independientes de su actividad quinasa, con varias proteínas implicadas en señalización y tráfico celular, como las subunidades Gαq y Gβγ de las proteínas G, la enzima PI3K, clatrina, GIT, caveolina, MEK, AKT, y RKIP (11, 12, 13), lo que amplía sus potenciales papeles fisiológicos (ver Tabla 1).

Por último, es importante tener en cuenta que se están detectando cambios en los niveles de GRKs y arrestinas en diversas situaciones fisiopatológicas inflamatorias (14), tumorales (15), cardiovasculares (16) o del sistema nervioso (5). También se están poniendo de manifiesto muy diversos mecanismos capaces de modular la expresión, estabilidad, estado de fosforilación y actividad de estas proteínas, paricularmente de la isoforma GRK2 (11, 17, 18, 19, 20, 21, 22, ver también Tabla 1).

En base a todo lo anterior, es de esperar que cambios en los niveles y/o funcionalidad de las GRKs y de las arrestinas puedan tener importantes repercusiones fisiopatológicas. Puesto que más del 90% de los GPCRs conocidos se expresan en el cerebro (23) y están implicados en prácticamente todas las funciones vitales controladas por el sistema nervioso, el estudio del papel que desempeñan GRKs y arrestinas en el control de los receptores cerebrales es un campo de gran interés.

Tabla 1. *Resumen de las interacciones funcionales de GRKs con otras proteínas celulares*

Proteína(s)	Subtipos GRK	Consecuencias funcionales
GPCRs	2-6	Fosforilación de GPCR.
Gα	2,3	Inhibición de Gαq y de estimulación de PLCβ.
Gαγ	2,3	Translocación de GRK a la membrana y aumento de actividad GRK.
MEK1/2	2	Inhibición de la estimulación de ERK1/2 por quimioquinas en linfocitos y en astrocitos.
Akt	2	Inhibición de la actividad Akt
PI3K	2	Favorece reclutamiento de PI3K a la membrana y de endocitosis de receptores.
GIT	2,3,5,6	La translocación de GIT1 a la membrana requiere GRK2. Interacción GIT1/GRK2 importante en migración epitelial.
RKIP	2	RKIP fosforilada por PKC se suelta de Raf-1 y se une a GRK2 para inhibir su actividad.
Calmudulina	2-6	Inhibición con potencia muy variable de las diversas GRKs.
p38	2	GRK2 fosforila a p38 e impide su activación y actividad.
p105	2,5,6	GRK5 fosforila 105 y previene su degradación inducida por LPS.
Hsp90	2,3,5,6	Favorece la maduración de GRK2 y estabiliza los niveles de GRK3, 5 y 6.
actina	5	Inhibición de la actividad GRK5.
α-actinina	2-6	Inhibición de la actividad catalítica de GRKs.
caveolina	2,3,5	Inhibición de GRK2 en determinadas localizaciones subcelulares.
ezrina	2	La fosforilación de ezrina por GRK2 favorece su conformación activa.
Tubulina	2,5	Fosforilación de tubulina.
synucleína	2,5	Fosforilación de synucleína que conlleva menor unión a fosfolípidos.
NHERF	6	Fosforilación de NHERF.
DREAM	2,6	Fosforilación de DREAM que afecta al tráfico de canales de potasio K 4.2.
Proteína ribosómal P2	2	La fosforilación por GRK2 aumenta su activación.
PKC	2,5	PKC fosforila GRK2 y la activa, y fosforila GRK5 inhibiéndola.
PIP2	2,6	Reclutamiento de GRKs a la membrana.
PKA	2,5	La fosforilación por PKA aumenta la unión de GRK2 a Gαγ y por tanto su actividad.

Tabla 1. *Resumen de las interacciones funcionales de GRKs con otras proteínas celulares* (Continuación)

Proteína(s)	Subtipos GRK	Consecuencias funcionales
ERK1/2	2	Fosforila a GRK2, inhibiendo su actividad y promoviendo su degradación.
Mdm2	2	Mdm2 es una E3-Ubiquitina ligasa de GRK2 y promueve su degradación.
clatrina	2	La asociación GRK/clatrina favorece internalización de GPCR.
R-smads	2	La fosforilación de R-smads previene su localización nuclear.
HDAC5	5	GRK5 fosforila a HDAC5.
fosducina	2	La fosforilación de fosducina por GRK2 inhibe su asociación a Gβγ.
Smo	2	GRK2 fosfosrila Smo y es precisa para su señalización.
NCS-1	2	La interacción NCS1-GRK2 modula la desensibilización de receptores D2 de dopamina.
ENaC	2	La interacción mantiene activo el canal.
Nedd4, Nedd4-2	2	Sustratos de GRK2.

La descripción de la mayor parte de estas interacciones se recoge en diversas revisones recientes (ver referencias 2, 3, 5, 7, 11 y 13).

GRK2

Distribución de GRK2 en cerebro y alteraciones en distintas situaciones

La quinasa GRK2 tiene una amplia expresión en el cerebro (24). El mensajero de esta quinasa se distribuye de forma prácticamente uniforme en todas las capas corticales, varios núcleos talámicos e hipotalámicos, el hipocampo, la substantia nigra, el locus coeruleus y otras regiones. En el caudado-putamen se detectan unos niveles de expresión menores (25). Como ha descrito nuestro laboratorio, la expresión de GRK2 está regulada durante el desarrollo, destacándose un notable incremento durante la segunda semana post-parto (26).

Se han observado alteraciones en la expresión de GRK2 tras determinados tratamientos farmacológicos y en diversas situaciones patológicas del cerebro (ver resumen en Figura 1). Así, en pacientes con depresión hay un aumento de la inmunorreactividad de GRK2 en la corteza prefrontal, mientras que tratamientos a largo plazo con antidepresivos disminuyen los niveles de esta prote-

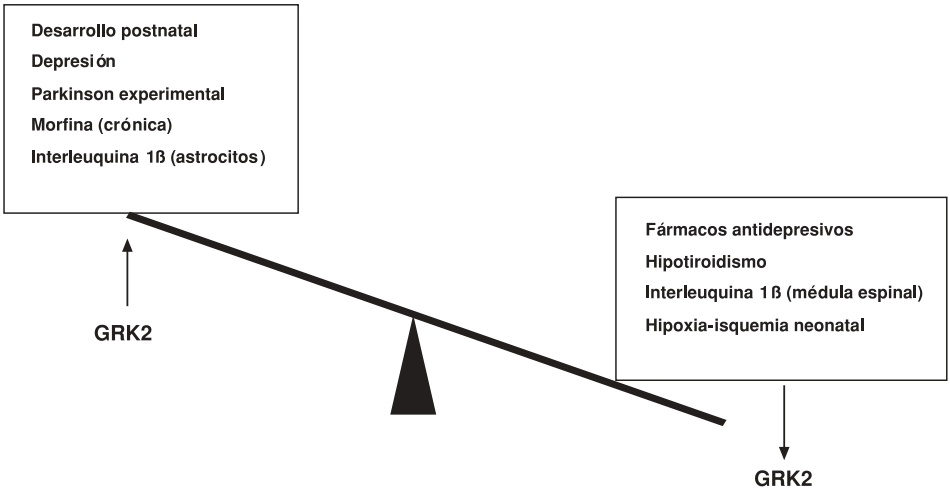


FIGURA 1. *Diversas situaciones y estímulos que modulan la expresión de GRK2 en el sistema nervioso. Ver texto principal para detalles.*

ína (27). GRK2 se encuentra incrementado igualmente en el núcleo caudado de monos con enfermedad de Parkinson experimental sugiriendo un posible papel para esta quinasa en la regulación de receptores de dopamina in vivo (28). Sin embargo, la respuesta de ratones parcialmente deficientes en GRK2 a un tratamiento con cocaína (que bloquea el transportador de dopamina e incrementa por tanto los niveles disponibles de este mensajero) o con el agonista del receptor de dopamina apomorfina no resulta en cambios muy significativos en el comportamiento locomotor de estos animales, sugiriendo que una pérdida parcial de GRK2 no tiene un impacto decisivo en las respuestas mediadas por dopamina (29). Quizá futuros estudios con ratones KO-específicos en regiones cerebrales concretas puedan ayudar a contestar esta pregunta.

El hipotiroidismo experimental también parece modificar los niveles de GRK2 en cerebro. Nuestro laboratorio ha encontrado en ratas hipotiroideas una disminución del 25% en los niveles de GRK2 en corteza cerebral, lo que podría afectar a la regulación de muchos receptores cerebrales (26).

GRK2, receptores μ-opioides y dolor

Diversas evidencias experimentales sugieren un papel para GRK2 en la regulación de receptores μ-opioides (μOR). Varios grupos, incluido el nuestro en

colaboración con el grupo del Dr. García-Sevilla, han encontrado que los niveles de GRK2 están aumentados en el locus coeruleus y en la corteza de ratas crónicamente tratadas con morfina, así como en las membranas cerebrales de autopsias provenientes de humanos adictos a opiáceos (30-32). El tratamiento crónico con etorfina, pero no con morfina, produce un aumento significativo de los niveles de proteína GRK2 en membranas de médula espinal de ratón (33). GRK2 también parece mediar la desensibilización de receptores opioides en células gabaérgicas que proyectan a la médula espinal (34). Todo ello sugiere que GRK2 contribuye a la desensibilización de receptor μ-opioides in vivo y que puede jugar un papel muy importante en la tolerancia a opiáceos y en la dependencia.

Aunque datos preliminares han sugerido que las respuestas analgésicas a morfina no están alteradas en ratones hemicigotos para GRK2 (35), otro manuscrito reciente indica que los niveles de expresión de GRK2 están fuertemente reducidos en la médula espinal de ratas neuropáticas, y que una reducción del 50% de los niveles de GRK2 aumentan la sensibilización a estímulos mecánicos promovidos por situaciones inflamatorias (36). De hecho, se ha observado que la sensibilidad a diversos receptores tipo GPCR implicados en la transmisión del dolor, como el receptor de neuroquinina 1 (NK1), receptores metabotrópicos de glutamato y el receptor de CGRP está profundamente afectada tanto por los niveles de GRK2 como de GRK6 (37, 38, 39, 40). Todo ello, junto con el hecho de que las GRKs juegan un papel muy importante en procesos inflamatorios, sugiere que estas quinasas y en particular GRK2 pueden desempeñar un papel en el contexto del dolor producido por inflamación o trauma tisular. El papel de GRK2 en estos contextos de hiperalgesia aguda o crónica está siendo muy activamente investigado por el grupo de las Dras. Cobi Heijnen y A. Kavelaars. En este sentido, es interesante constatar que los niveles de expresión de las GRKs puede ser modificadas en tejido nervioso por citoquinas proinflamatorias. Así, la interleuquina 1β disminuye la expresión de GRK2 en cortex de médula espinal (41). Por el contrario, nuestro grupo ha observado en colaboración con la Dra. Cobi Heijnen que esta citoquina aumenta los niveles de GRK2 en astrocitos, lo que conduce a una señalización alterada de quimioquinas en este tipo celular (42).

GRK2 y situaciones de hipoxia-isquemia

Se ha sugerido también un papel de los niveles de GRK2 en la respuesta del cerebro inmaduro a hipoxia-isquemia. El daño cerebral por hipoxia-isquemia se regula en parte por neurotransmisores y quimioquinas que señalizan a

través de GPCRs. GRK2 protegería en principio de un exceso de estimulación de esos receptores induciendo su desensibilización. Es interesante que daño cerebral hipóxico-isquémico neonatal es acompañado por una reducción en los niveles cerebrales de GRK2 (43). Experimentalmente se ha mostrado que ratones de 9 días hemicigotos para GRK2 muestran un mayor daño en materia blanca y gris a las tres semanas después de un episodio de hipoxia-isquemia que sus hermanos de camada, mostrando además una mayor infiltración por neutrófilos. Todo ello sugiere un papel importante para GRK2 en la modulación de estas vías de señalización relacionadas con daño hipóxico-isquémico.

GRK2 y señalización neuroendocrina

Desde el punto de vista neuroendocrino se ha indicado que GRK2 puede tener un papel en la regulación del receptor del factor liberador de corticotropina en la pituitaria anterior (44), así como en la modulación de la señalización de TSH y de la liberación de gonodotrofinas.

La expresión de GRK2 atenúa la señalización del receptor del factor liberador de gonadotrofinas GnRH en células de pituitaria, y suprime la secreción de la hormona luteinizante LH en respuesta a ese estímulo (45). Por otra parte, un aumento de los niveles de GRK2 en células FRTL-5 disminuye la respuesta de estas células a la hormona TSH, sugiriendo que esta quinasa está tónicamente implicada en la modulación de su receptor (46). Se ha sugerido también que la respuesta de los receptores de hormonas neuroendocrinas presentes en las células del sistema inmune pueda verse afectada por los cambios en los niveles de GRK2 que se producen en esas células en situaciones inflamatorias (47).

GRK2 y enfermedades neurodegenerativas

El posible papel de GRKs en enfermedades neurodegenerativas ha sido aún poco explorado. Las sinucleínas, unas proteínas altamente expresadas en el cerebro y relacionadas con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer pueden ser fosforiladas tanto por GRK2 como GRK5 (48). Por otra parte, los niveles de GRK2 y GRK5 membranales se han encontrado significativamente reducidas en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer (49). Este cambio en los niveles de GRK2 precede a las alteraciones cognitivas y se correlaciona con una hiperactividad de GPCRs de trombina y glutamato en células de glía. Más recientemente se ha detectado una

relación positiva entre los niveles de GRK2 en sangre periférica y la severidad de la enfermedad en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (50). Sin embargo queda por determinar si esta expresión alterada en sangre refleja cambios en la expresión de GRK2 en el cerebro y si estos cambios son específicos de la enfermedad de Alzheimer frente a otras enfermedades neurodegenarativas. Aunque también se ha detectado la presencia de GRK2 en filamentos helicoidales apareados ("tangles") en pacientes de esta enfermedad (51), el papel patológico de cambios en los niveles de esta quinasa es aún muy especulativo (52).

Relevancia de nuevas interacciones funcionales de GRK2

El paradigma científico actual siempre ha intentado correlacionar los cambios en la expresión o funcionalidad de GRK2 con la alteración de la señalización mediada por GPCRs, siempre considerando a GRK2 como un modulador negativo de estos receptores, de tal forma que incrementos en la actividad/ niveles de GRK2 u otras GRKs conducirían a una menor señalización, mientras que una disminución en esos parámetros conllevaría necesariamente una más potente transducción de la señal a través de GPCRs. Sin embargo, las nuevas funciones emergentes de GRK2 y de otras GRKs independientes de la fosforilación de GPCRs (Tabla 1) abren nuevas perspectivas y nuevas posibilidades de consecuencias funcionales de alteraciones en estas quinasas, que sólo ahora han comenzado a explorarse.

Entre los primeros ejemplos de estas nuevas funciones reguladoras de GRKs en cerebro se encuentra la capacidad de GRK2 de bloquear la señal de receptores metabotrópicos de glutamato de forma independiente de actividad quinasa y del reclutamiento de la proteína reguladora β-arrestina, y dependiente de su capacidad de interacturar con Gq (53). En otro contexto, nuestro grupo y el de la Dra Heijnen ha descrito que GRK2 atenúa la señalización de la quimioquina CCL2 en astrocitos a través de la regulación específica de las interfases PI3K-AKT y MEK/ERK, pero no a nivel de segundos mensajeros clásicos de GPCRs como son los niveles de calcio (42). La presencia de EGF se ha mostrado recientemente que fomenta la asociación de su receptor con GRK2, seguida por la fosforilación de GRK2 en residuos de tirosina, lo que incrementa el grado de activación de la quinasa y conduce a una mayor "downregulation" de receptores opiáceos co-expresados (9). La posibilidad de que GRK2 modifique el proceso de transmodulación de otros receptores GPCR por aquellos con actividad tirosina quinasa es una interesante posibilidad que todavía no ha sido explorada en el sistema nervioso. Lo mismo sucede con las posibles repercusiones funcionales en el cerebro de la capacidad de GRK2 de fosforilar sustratos no-GPCRs como tubulina, fosducina, canales

de sodio o la p38 MAP quinasa, o de su capacidad de interaccionar con otras proteínas celulares (11,54). Por ejemplo, se ha descrito recientemente que la proteína GIT1, capaz de interaccionar con GRKs, es un factor que promueve la agregación de huntingtina, y que GIT1 proteolizada se acumula en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Huntington (55). Quizá la acumulación de fragmentos de GIT1 capaces de unir a GRKs pueda alterar las funciones de éstas y su localización en las células nerviosas. Otra hipótesis interesante sugiere que el sensor de calcio neuronal NCS1, cuya expresión se encuentra alterada en esquizofrenia y en desórdenes bipolares, pueda contribuir a través de su interacción con GRK2 a la alteración de la regulación de receptores de dopamina en estas patologías (56,57).

GRK3

Distribución de GRK3 en el sistema nervioso

GRK3 también se expresa ampliamente en el Sistema nervioso central y periférico, aunque a niveles menores a los que lo hace GRK2 (24). En el sistema nervioso periférico GRK3 se encuentra significativamente expresada en neuronas olfativas y neuronas del glanglio dorsal, donde podría desempeñar un papel importe en la desensibilización de receptores de aromas y en la modulación de receptores α-adrenérgicos, respectivamente (58, 59, 60). De hecho, los ratones que carecen de GRK3 presentan una clara alteración de la respuesta a aromas en el epitelio olfativo (60, ver Tabla 2).

Regulación de receptores cerebrales por GRK3 e implicaciones fisiopatológicas

Diversas evidencias "in vitro" indican que GRK3 tiene un papel relevante en la regulación de receptores de dopamina en el cerebro (29). En este sentido es interesante destacar que la región del cromosoma 22q12 donde se encuentra el gen para GRK3 es un locus de susceptibilidad para el desarrollo de desórdenes bipolares (61). Por otra parte, polimorfismos en la zona 5'UTR del promotor de GRK3 se han asociado también con estas patologías (61). Estos hallazgos sugirieren que una desregulación de la expresión de GRK3 podría afectar la desensibilización de receptores de dopamina, lo que predispondría a determinados pacientes a esta alteración neurológica.

Otros datos recientes indican que el agente antipsicótico haloperidol disminuye los niveles de GRK3 en el caudado-putamen ventrolateral, mientras que este fárma-

Tabla 2. *Patrón de expresión de GRKs y arrestinas y fenotipos de ratones que carecen de estas proteínas*

GRK o arrestina	Expresión	Fenotipo a que da lugar su carencia en el Sistema nervioso
GRK1	Retina (conos y bastones)	Ceguera noctuna de Oguchi (humano) Degeneración de retina (ratón)
GRK2	Ubicua, alta expresión en Cerebro.	Letal embrionario por hipoplasia cardiaca.
GRK3	Ubicua, menor expresión que GRK2 en cerebro	Desensibilización olfatoria alterada Regulación pulmonar por receptores muscarínicos alterada. Tolerancia reducida a opioides.
GRK4	Testículos y cerebro (bajos niveles)	No fenotipo en Sistema Nervioso.
GRK5	Ubicua	Regulación alterada de receptores M2-muscarínicos centrales y de pulmón, pero no de corazón.
GRK6	Ubicua	Regulación alterada de receptores de dopamina.
GRK7	Conos de la retina	(El gen no está presente en ratones pero sí en humanos).
Arrestina visual	Conos de la retina	Ceguera noctuna de Oguchi (humano). Degeneración de retina (ratón).
βarrestina-1 (arrestina 2)	Ubicua, alta expresión en cerebro	No fenotipo conocido en Sistema Nervioso.
βarrestina-2 (arrestina 3)	Ubicua, menor expresión que β-arrestina-1 en cerebro	Mayor efecto antinociceptivo de morfina y de recompensa. Tolerancia a morfina alterada. Respuestas locomotoras y de comportamiento a dopamina alteradas.

Las referencias se citan en el texto. Adaptado de Premont y Gainetdinov (5).

co promovía la disminución de la quinasa GRK5 en otras regiones (62). Por el contrario el fármaco clozapina promovía un efecto diferencial en la expresión de estas quinasas y también de las proteínas reguladoras arrestinas en otras zonas cerebrales (62), lo que es indicativo de la complejidad de estos efectos y de la importancia de la distribución regional de los cambios observados, ya que los GPCRs cuya función pueda alterarse dependerá mucho de la localización precisa de esos cambios de expresión. En este sentido, otro grupo ha sugerido que GRK3 sería importante en la

desensibilización de autoreceptores de dopamina D3, afectando de esta manera a los procesos que controlan la liberación de dopamina (63). A diferencia de lo que sucede para el caso de GRK2, no ha podido establecerse con claridad la participación de GRK3 en la regulación de receptores μ-opiacéos, existiendo datos muy contradictorios al respecto (5). Sí ha podido establecerse que la activación del sistema KAPPA-opioide por dolor neuropáptico en médula espinal de ratón y procesos de tolerancia relacionados están disminuidos en ratones carentes de GRK3 (64,65).

En lo que respecta a enfermedades neurodegenerativas hay poca información sobre posibles cambios en los niveles de GRK3, si bien un grupo ha publicado recientemente que los niveles de GRK3 y GRK5 están específicamente aumentados, junto con los de ambas arrestinas, en la región estriada de pacientes con la enfermedad de Parkinson (66).

GRK4

La expresión de GRK4 en el cerebro se limita a las células de Purkinje del cerebelo (67). Esta quinasa podría regular los receptores metabotrópicos de glutamato tipo 1 y los receptores tipo GABA-B presentes en esa estructura cerebral lo que sugeriría la participación de GRK4 en la coordinación motora (68, 69). Sin embargo, no se han detectado alteraciones en actividad locomotora basal o en la respuesta a cocaína en ratones deficientes para GRK4 (5).

GRK5

Distribución en sistema nervioso

GRK5 es una isoforma de expresión ubicua en todos los tejidos del organismo, y por tanto también en el sistema nervioso central. Su expresión es particularmente elevada, al menos a nivel de mensajero, en regiones como el septum, la corteza cingulada, ciertos núcleos talámicos o el locus coeruleus (25). La expresión de GRK5 parece aumentar durante la diferenciación neuronal (70).

Fenotipos de ratones carentes de GRK5

Los ratones que carecen de GRK5 muestran un fenotipo aparentemente normal, si bien muestran una ligera disminución de la temperatura corporal (71). La esti-

mulación de actividades locomotoras con cocaína o con el agonista de dopamina apomorfina no mostró diferencias significativas en estos animales con respecto a los controles. Los ratones deficientes de GRK5 tampoco mostraban alteraciones en las respuestas hipotérmicas normalmente inducidas por agonistas del receptor 5-HT1A de serotonina (29, 71). Estos datos indicaban que la respuesta de los receptores de dopamina, μ-opiaceos o de serotonina relacionadas con estos procesos fisiológicos y de comportamiento no se afectaba por la delección de GRK5. Sin embargo, la respuesta de estos animales de experimentación al agonista muscarínico oxotremorina, que controla respuestas centrales como hipotermia, temblor, salivación y antinocicepción, estaban significativamente aumentados en estos individuos (71), lo que indicaba su participación en la regulación de receptores M2-muscarínicos "in vivo". Es curioso hacer notar que otros estudios recientes han confirmado que la respuesta a receptores M2 en ratones knockout para GRK5 está afectada en otros tejidos como el pulmón pero no en el corazón (5, 72). Todo esto sugiere que la misma GRK puede regular el mismo GPCR de forma diferencial en diferentes tejidos.

GRK5 en enfermedades neurodegenerativas

Como se ha mencionado en un apartado anterior, los niveles tanto de GRK2 como de GRK5 parecen estar alterados en algunos modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer (49). Datos recientes han indicado que la deficiencia en GRK5 da lugar a menores niveles de acetil-colina en el hipocampo, al alterar la desensibilización de autoreceptores M2/M4 muscarínicos presinápticos (73), lo que sugiere una correlación funcional con las alteraciones en la señalización colinérgica que se observan en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo aún queda mucho por explorar en el conocimiento de la implicación de GRK5 en el control de las acciones de los neurotransmisores "in vivo".

GRK6

Patrón de expresión

GRK6 se expresa ubicuamente en el sistema nervioso central (74). Esta quinasa parece ser la más abundante de todas las GRKs en el caudado-putamen, y su mensajero también se expresa en muchos cuerpos neuronales dopaminérgicos como los de las sustancia nigra (25). En el estriado la proteína GRK6 se expresa en neuronas gabaérgicas y en interneuronas colinérgicas que responden a dopamina (75).

Regulación de receptores cerebrales mediada por GRK6

Los ratones deficientes en GRK6 muestran una supersensibilidad locomotora muy significativa a cocaína, anfetamina y morfina (75). Éstas y otras investigaciones han indicado que los receptores de dopamina D2 postsinápticos en el estriado son dianas fisiológicas de la regulación por GRK6, sugiriendo que una estrategia farmacológica dirigida a modular la expresión o actividad de GRK6 sería beneficiosa en situaciones en las que la señalización por dopamina está alterada, como el caso de la enfermedad de Parkinson (5). De hecho, la expresión de GRK6 está significativamente elevada en diversas áreas del cerebro, incluido el estriado en modelos de primates de la enfermedad de Parkinson (28). Por otra parte, puesto que la supersensibilidad a dopamina también está presente en otros desórdenes cerebrales, como adicción y esquizofrenia (76), será interesante estudiar un posible papel de GRK6 en estas situaciones fisiopatológicas. En este sentido, datos recientes sugieren que las respuestas fisiológicas y comportamentales inducidas por morfina están alteradas selectivamente en ratones deficientes en GRK6 (77). Por último, otro campo emergente de notable interés, como sucede en el caso de GRK2, es la participación de GRK6 en la respuesta al dolor postinflamatorio. Así, se ha indicado recientemente que GRK6 controla la hiperalgesia visceral postinflamatoria (78).

β-arrestinas

Distribución en el sistema nervioso

La proteína reguladora β-arrestina-1 se expresa ubicuamente en el cerebro (26, 29, 70, 79, 80, 81). Sus niveles de mensajero se estiman dos o tres veces mayores que los de la β-arrestina-2, mientras que los valores de expresión de proteína son 10 veces mayores (81). Por tanto, la isoforma β-arrestina-2, a pesar de este significativo solapamiento en su patrón de expresión con la β-arrestina-1, parece requerir una expresión mucho menor para realizar sus funciones fisiológicas. Existen sin embargo algunas zonas del cerebro, como la amígdala y la mayor parte de los núcleos hipotalámicos, en los que la β-arrestina-2 presenta mayores niveles relativos que la β-arrestina-1 (81). Se ha detectado también una notable inmuno-reactividad de β-arrestina-1 en densidades postsinápticas de la médula espinal (82). Por otra parte, la expresión de β-arrestina-1, como ha demostrado el laboratorio de Gurevich y nuestro propio grupo, aumenta considerablemente durante el desarrollo neuronal sugiriendo un papel específi-

co para esta proteína en la diferenciación neuronal (26, 70). Nuestro grupo también ha descrito un modesto efecto del hipotiroidismo experimental en los niveles de β-arrestina-1 durante el desarrollo postnatal (26). Aunque tratamientos crónicos o agudos con morfina incrementan la expresión de β-arrestina-1 en el locus coeruleous y en otras áreas, la respuesta antinociceptiva a morfina no se ve alterada en ratones carentes de β-arrestina-1 (30, 35, 83).

Es curioso indicar que los niveles de β-arrestina-1 en leucocitos de pacientes depresivos están reducidos mientras que su presencia en corteza cerebral de rata e hipocampo se eleva tras tratamiento crónico con los antidepresivos imipramina o desipramina (84). La reducción de los niveles de β-arrestina en los linfocitos de pacientes con depresión mayor se correlacionaba significativamente con la severidad de los síntomas depresivos (84).

β-arrestinas y acción de opiáceos

Diversos estudios indican que β-arrestina 2 está implicada en la regulación de receptores μ-opioides y en los efectos de los opiáceos. Distintos grupos han mostrado que los tratamientos agudos o crónicos con ligandos μ-opioides, incluyendo la morfina, causan alteraciones significativas en la expresión de β-arrestina-2 en la corteza y el estriado (32, 85, 83). El pretratamiento intratecal con un anticuerpo anti β-arrestina-2 potencia la antinocicepción inducida por agonistas μ-opioides en el ratón, lo que es coherente con un papel en la modulación de la antinocicepción a nivel de médula espinal (86).

Un aspecto muy controvertido de estudios "in vitro" ha sido el efecto diferencial de opiáceos, y en particular de la morfina, en promover el reclutamiento de β-arrestina-2 y la endocitosis del receptor. Aunque trabajos previos en sistemas heterólogos sugerían que la morfina no sería capaz de promover eficazmente el reclutamiento de β-arrestina y la endocitosis del receptor (87, 88) datos más recientes en cultivos primarios de neuronas estriatales y datos "in vivo" indican fuertemente que la morfina es capaz de promover una rápida endocitosis de receptores μ-opioides in vivo y que la β-arrestina-2 juega un papel importante en ese proceso (89, 90, 91, 92). Ello refuerza la importancia de realizar los estudios en los modelos celulares más cercanos a los fisiológicos.

En lo que respecta a estudios con ratones deficientes en β-arrestina-2, estos animales muestran una mayor respuesta antinociceptiva a morfina que se correlaciona con una mayor señalización a través de estos receptores en estas condiciones (90, 93). Más aún, la tolerancia a estos efectos antinociceptivos estaba atenua-

da en los ratones carentes de β-arrestina-2 (91). Otros efectos bien conocidos de la morfina como el estreñimiento o la atenuación de la respiración estaban sin embargo sorprendentemente reducidos en los ratones knockout para β-arrestina-2 (94).

β-arrestinas y modulación de las acciones de receptores de dopamina

El ratón knockout para β-arrestina-2 muestras alteraciones significativas en las respuestas locomotoras y de recompensa de la morfina, que requieren tanto la activación de receptores μ-opioides como indirectamente de dopamina, a través de la estimulación por morfina de mecanismos de liberación de dopamina (95, 96). En los ratones deficientes para β-arrestina-2 la morfina, pero no la cocaína, producen una mayor respuesta de liberación de dopamina y de recompensa en las pruebas habituales en estos casos. Sin embargo, la administración aguda de morfina induce una menor activación locomotora en estos animales, lo que sugería que β-arrestina-2 pudiese tener un papel positivo y no sólo de regulador negativo en la señalización dopaminérgica (96).

En línea con esas observaciones, datos muy recientes han mostrado un importante papel para β-arrestina-2 en la señalización mediada por receptores D2 dopaminérgicos "in vivo". Clásicamente las funciones de los receptores de dopamina se han asociado con la regulación de la vía de transducción AMPc-PKA a través de proteínas G heterotriméricas. Los receptores de dopamina D1 y D5 se acoplan a través de Gs a la estimulación de la producción de AMPc y a la activación de PKA. Por el contrario, los receptores D2, D3 y D4 se acoplan a Gi/o e inhiben la producción de AMP cíclico y la estimulación de PKA. La eficacia clínica de muchos fármacos antipsicóticos se correlaciona con su capacidad para actuar como antagonistas del receptor de dopamina D2 (97). Investigaciones más recientes han mostrado que además de estos efectos "canónicos" los receptores de dopamina ejercen sus efectos "in vivo" también a través de mecanismos independientes de AMPc. La ocupación del receptor D2 por un agonista promueve la fosforilación del receptor por GRKs, lo que a su vez permite el reclutamiento de la proteína β-arrestina, impidiendo el acoplamiento a la proteína Gi. Además, los agonistas D2 activan a la enzima GSK3β. Esto es así porque el receptor recluta junto con la β-arrestina a la proteína fosfatasa 2 y a la quinasa Akt activa (76, 98). Este reclutamiento promueve un cambio conformacional en la β-arrestina que impulsa a PP2A a defosforilar y desactivar a Akt, lo que a su vez facilita la defosforilación y la activación del sustrato de Akt, GSK3β (ver Figura 2). Esta compleja regulación ocurre de forma independiente y secuencial (es mas tardía) de la tradicional modulación de los niveles de AMPc.

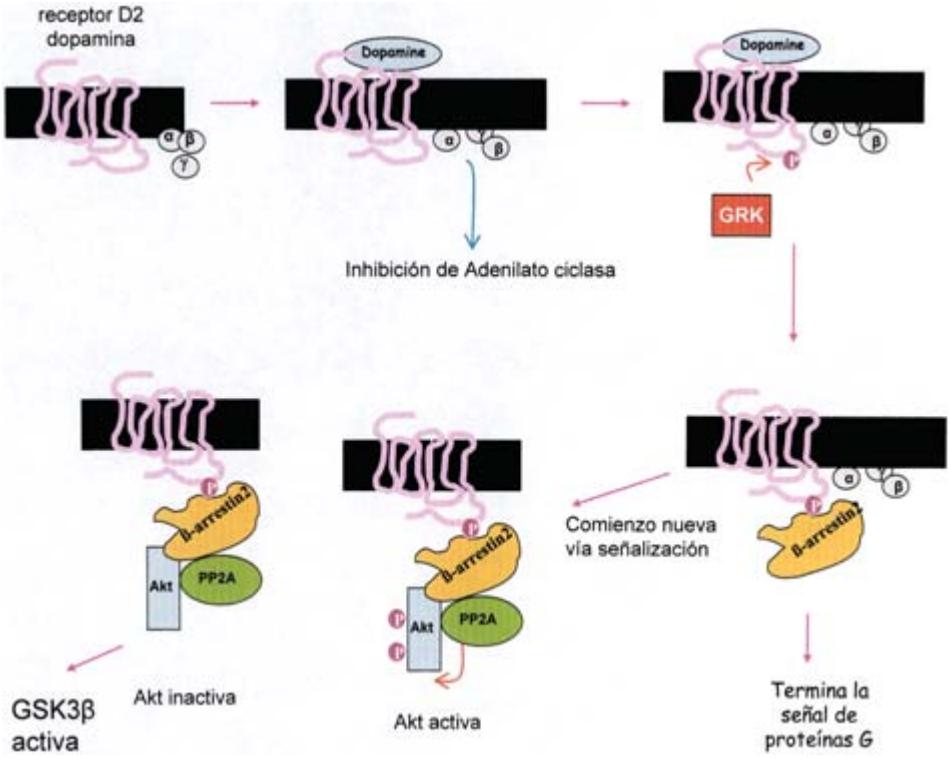


Figura 2. *La estimulación del receptor D2 de dopamina conduce tanto a la modulación de los niveles de AMPc a través de proteínas G heterotriméricas, como al control de la actividad del eje Akt/GSK3β, por medio del reclutamiento de complejos β-arrestina-2/PP2A/Akt.*

Estos estudios "in vitro" del Grupo de Marc G. Caron han sido claves para entender el fenotipo observado en ratones deficientes en β-arrestina 2. Estos animales muestran una reducción de la respuesta conductual a anfetamina y apomorfina, una pérdida de la regulación de la vía de señalización de AKT por dopamina y una abolición de la interacción entre AKT y PP2A dependiente de dopamina. Más aún, la ausencia de β-arrestina-2 resulta en un menor nivel de actividad locomotora espontánea tanto en ratones normales como ratones hiperdopaminérgicos que carecen del transportador de dopamina, lo que demuestsra un papel crítico de β-arrestina-2 en la señalización dopaminérgica (76, 97). Estos estudios han mostrado por primera vez "in vivo" el papel dual de β-arrestina en la regulación de GPCRs. Además de su papel "negativo" clásico en la desensibilización de receptores, en el que las β-arrestinas son críticas para inhibir la señalización de receptores a las proteínas G-heterotriméricas, la β-arrestina-2

también puede actuar de forma "positiva" en procesos de señalización, actuando como una proteína andamio de otras quinasas y fosfatasas como PP2A y AKT.

Es también muy interesante destacar que muy recientemente se ha investigado si los fármacos antipsicóticos pueden modular la capacidad de agonistas de receptores de dopamina de reclutar β-arrestina 2. Sorprendentemente, estos antagonistas bloquean el reclutamiento de β-arrestina 2 con mucha mayor potencia que su efecto en la acumulación de AMPc, impidiendo la desactivación de Akt por el agonista (76, 97). Dada la importancia de la cascada AKT/GSK3 en la patología de la esquizofrenia, se abre una posibilidad muy atractiva que es la de identificar fármacos que bloqueen de forma preferencial la capacidad del receptor de dopamina de reclutar β-arrestina 2. Estos bloqueadores específicos o preferentes de la señalización por β-arrestina ya se han identificado en el sistema β-adrenérgico en el contexto cardiovascular (97).

CONCLUSIONES

Las evidencias acumuladas en los últimos años muestran claramente un papel clave para las GRKs y las arrestinas en la modulación de las acciones de los receptores cerebrales. Sin embargo, existen todavía muchas incógnitas que deben ser desveladas. Así, debe investigarse con más detalle la distribución regional y de tipo celular de las diversas GRKs y arrestinas en el sistema nervioso y su especificidad o no en cuanto a la modulación de receptores concretos. Por otra parte, es esencial también identificar las circunstancias fisiopatológicas y los mecanismos que pueden modular los niveles de expresión de estas proteínas en el sistema nervioso.

En cuanto a la repercusión funcional de esas alteraciones, el sistema GRKs/arrestinas presenta la complejidad adicional de su papel dual en señalización, tanto suprimiendo la señalización de GPCRs a través de proteínas G heterotriméricas, como teniendo un papel positivo al iniciar nuevas vías de señalización. Por tanto, una disminución en los niveles de GRKs puede tener efectos opuestos en funciones fisiológicas: puede promover una mayor respuesta de GPCRs al dar lugar a una deficiente desensibilización, o por el contrario puede disminuir aquellas respuestas dependientes de la activación del eje de señalización GPCRs/GRKs/arrestinas. El uso combinado de sistemas celulares y animales, así como un mejor conocimiento del interactoma de las GRKs y las arrestinas nos ayudarán a conocer mejor el papel de estas proteínas en el sistema nervioso y al diseño de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

AGRADECIMIENTOS

La investigación de mi grupo está financiada por ayudas del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-0552), la RED de Investigación Cooperativa en Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA) del Instituto de Salud "Carlos III" (RD0-0014/0037), la Red de Excelencia INSINET de la Comunidad de Madrid (S-SAL-0159-2006) y la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., *et al*. (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *Chem. Med. Chem*. 1: 761-782.

(2) Penela, P., Ribas, C., y Mayor, F., Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell. Signal*. 15: 973-981.

(3) Reiter, E., Lefkowitz, R.J. (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 17: 159-65.

(4) Moore, C.A., Milano, S.K., y Benovic, JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*. 69: 451-482.

(5) Premont, R.T., Gainetdinov, R.R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*. 69: 511-534.

(6) DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., *et al*. (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*. 69: 483-510.

(7) Hupfeld, C.J., Olefsky, J.M. (2007) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins. *Annu Rev Physiol*. 69: 561-577.

(8) Hildreth, K.L., Wu, J.H., Barak, L.S., *et al*. (2004) Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor. *J. Biol Chem*. 279: 41775-41782.

(9) Chen, Y., Long, H., Wu, Z., *et al*. (2008) EGF Transregulates Opioid Receptors through EGFR-mediated GRK2 Phosphorylation and Activation. *Mol. Biol. Cell*. 19: 2973-2983.

(10) Ho, J., Cocolakis, E., Dumas, V.M., *et al*. (2005) The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *Embo J*. 24: 3247-3458.

(11) Ribas. C., Penela. P., Murga. C., *et al*. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1768: 913-922.

(12) Jimenez-Sainz. M.C., Murga .C., Kavelaars. A., *et al*. (2006) G Protein-coupled Receptor Kinase 2 Negatively Regulates Chemokine Signaling at a Level Downstream from G Protein Subunits. *Mol Biol Cell*. 17: 25-31.

(13) Penela. P., Ribas. C., Aymerich. I., *et al*.. (2008) G protein-coupled receptor kinase 2 positively regulates epithelial cell migration. *Embo J*. 27: 1206-1218.

(14) Vroon. A., Heijnen. C.J., y Kavelaars .A. (2006) GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J. Leukoc Biol*. 80: 1214-21.

(15) Metaye. T., Gibelin. H., Perdrisot. R., *et al*. (2005) Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal*. 17: 917-28.

(16) Penela. P., Murga. C., Ribas. C., *et al*. (2006) Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 69: 46-56.

(17) Elorza, A., Sarnago, S., Mayor, F., Jr. (2000) Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol*. 57: 778-83.

(18) Sarnago, S., Elorza, A., Mayor, F., Jr. (1999) Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J. Biol Chem*. 274: 34411-34416.

(19) Ramos-Ruiz, R., Penela, P., Penn, R.B., *et al*. (2000) Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation*. 101: 2083-2089.

(20) Penela, P., Elorza, A., Sarnago, S., *et al*. (2001) Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J*. 20: 5129-5138.

(21) Elorza, A., Penela, P., Sarnago, S., *et al*. (2003) MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem*. 278: 29164-73.

(22) Salcedo, A., Mayor, F. J.r., Penela, P. (2006) Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J*. 25: 4752-62.

(23) Vasilates, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., *et al*. (2003) The G protein-coupled receptor repertories of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 4903-4908.

(24) Arriza, J.L., Dawson, T.M., Simerly, R.B., *et al*. (1992) The G protein-coupled receptor kinase βARK1 and βARK2 are widely distributed at synapses in rat brain. *J. Neurosci*. 12: 4045-4055.

(25) Erdtmann-vourliotis, M., Mayer, P., Ammon, S., *et al*. (2001) Distribution of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2,3,5 and 6 mRNA in the rat brain. *Br. Res. Mol. Br. Res*. 95: 129-137.

(26) Penela P., Alvarez-Dolado, M., Muñoz, A., *et al*. (2000) Expression patterns of the regulatory proteins G protein-coupled receptor kinase 2 and β-arrestin 1 during rat postnatal brain development: effect of hypothyroidism. *Eur. J. Biochem*. 267: 4390-4396.

(27) Grange-Midroit, M., García-Sevilla, J.A., Ferrer-Alcon, M., *et al*. (2003) Regulation of GRK 2 and 6, β-arrestin-2 and associated proteins in the prefrontal cortex of drug-free and antidepressant drug-treated subjects with major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 313.317.

(28) Bezar E., Gross, C.E., Qin, L., *et al*. (2005) L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol. Dis*. 18: 323-335.

(29) Gainetedinov, R.R., Premont, R.T., *et al*. (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Ann. Rev. Neurosci*. 27: 107-144.

(30) Terwilliger, R.Z., J. Ortiz, *et al*. (1994). Chronic morphine administration increases beta-adrenergic receptor kinase (beta ARK) levels in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* 63: 1983-1986.

(31) Ozaita, A., P.V. Escriba, *et al*. (1998). Regulation of G protein-coupled receptor kinase 2 in brains of opiate-treated rats and human opiate addicts. *J. Neurochem* 70: 1249-57.

(32) Hurle, M.A. (2001). Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in rat brain during opioid tolerance and supersensitivity. *J. Neurochem* 77: 486-92.

(33) Narita, M., M. Suzuki, *et al*. (2006). mu-Opioid receptor internalization-dependent and -independent mechanisms of the development of tolerance to mu-opioid receptor agonists: Comparison between etorphine and morphine. *Neuroscience* 138: 609-619.

(34) Li, A.H. and H.L. Wang (2001) G protein-coupled receptor kinase 2 mediates mu-opioid receptor desensitization in GABAergic neurons of the nucleus raphe magnus. *J. Neurochem* 77: 435-444.

(35) Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R. Caron, M.G. (2004) G protein-coupled receptor kinase/beta-arrestin systems and drugs of abuse: psychostimulatn and opiate studies in knockout mic. *Neuromol. Med*. 5: 41-50.

(36) Kleibeuker, W., Ledeboer, A., Eijkelkamp, N., *et al* (2007) A role for G protein-coupled receptor kinase 2 in mechanical allodynia. *Eur. J. Neurosci*. 25: 1696-1704.

(37) Aiyar, N., *et al*. (2000) Involvement of G protein-coupled receptor kinase-6 in desensitization of CGRP receptors. *Eur. J. Pharmacol*. 403: 1-7.

(38) McColnalogue, K., Corvera, C.U., Gamp, P.D., *et al*. (1998). Desensitization of the neurokinin-1-receptor (NK_1-R) in neurons: effects of substance P on the distribution of NK_1-R, Galphaq/$_{11}$, G-protein receptor kinase 2/3, and beta-arrestin-1/2. *Mol. Biol. Cell*. 9: 2305-2324.

(39) Barak, L.S., Warabi, K., Feng, X., *et al*. (1999) Real-time visualization of the cellular redistribution of G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 during homologous desensitization of the substance P receptor. *J. Biol. Chem*. 274, 7565-7569.

(40) Dhami, G.K., Fergusson, S.S. (1995) Rgulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensetization and endocytosis. *Pharmacol. Ther*. 111: 260-271.

(41) Kleibeuker, W., Gabay, E., Kavelaars, A., *et al*. (2008) IL-1 beta signaling is required for mechanical allodynia induced by nerve injury and for the ensuing reduction in spinal cord neuronal GRK2. *Brain Behav. Immun*. 22: 200-208.

(42) Kleibeuker, W., Jurado-Pueyo, M., Murga, C., *et al*. (2008) Physiological changes in GRK2 regulate CCL2-induced signaling to ERK1/2 and Akt but not to MEK1/2 and calcium. *J. Neurochem*. 104: 979-992.

(43) Nijboer, C.H., Kavelaars, A., Vroon, A., *et al*. (2008) Low endogenous G-protein-coupled receptor kinase 2 sensitizes the immature brain to hypoxia-ischemia-induced gray and white matter damage. *J. Neurosci*. 28: 3324-3332.

(44) Kageyama, K., Hanada, K., Moriyama, T., *et al*. (2006) G protein-coupled receptor kinase 2 involvement in desensitization of corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 1 by CRF in murine corticotrophs. *Endocrinology* 147: 441-450.

(45) Neill, J.D., Musgrove, L.C., Duck, L.W., *et al*. (1999). High efficiency method for gene transfer in normal pituitary gonadotropes: adenoviral-mediated expression of G protein-coupled receptor kinase 2 suppresses luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 140: 2562-2569.

(46) Iacovelli, L., Franchetti, R., Grisolía, D., *et al*. (1999). Selective regulation of G protein-coupled receptor-mediated signaling by G protein-coupled receptor kinase 2 in FRTL-5 cells: analysis of thyrotropin, alpha (1B)-adrenergic, and A(1) adenosine receptor-mediated responses. *Mol. Pharmacol*. 56: 316-324.

(47) Heijnen, C.J. (2007). Receptor regulation in neuroendocrine-immune communication: current knowledge and future perspectives. Brain Behav. Immun. 21: 1-8.

(48) Pronin, A.N., A.J. Morris, *et al*. (2000). Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. J. Biol. Chem. 275: 26515-26522.

(49) Suo, Z., M. Wu, *et al*. (2004). Abnormality of G-protein-coupled receptor kinases at prodromal and early stages of Alzheimer's disease: an association with early beta-amyloid accumulation. *J. Neurosci*. 24: 3444-3452.

(50) Leosco D., Fortunato F., Rengo G., *et al* (2007) Lymphocyte G-protein-coupled receptor kinase-2 is upregulated in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 415: 279-82.

(51) Takahasi, M., Uchikado, H., Caprotti, D., *et al*. (2006) Identification of G-protein coupled receptor kinase 2 in paired helical filaments and neurofibrillary tangles. *J. Neurophatol. Exp. Neurol*. 65: 1157-1169.

(52) Obrenovich, M.E., Morales, L.A., Cobb, C.J. (2009) Insights into cerebrovascular complications and Alzheimer disease through the selective loss of GRKs regulation.. *J. Cell. Mol. Med*. 13: 853-865.

(53) Ribeiro, F.M., Ferreira, L.T., Paquet, M., *et al*. (2009) Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 5 desensitization and internalization by G protein-coupled receptor kinase 2 in neurons. *J. Biol. Chem*. 284: 23444-23453.

(54) Peregrin, S., Jurado-Pueyo, M., Campos, P.M., *et al*. (2006) Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38 MAPK. *Curr Biol*. 16: 2042-2047.

(55) Goehler, H., lalowski, M., Stelzl. U., *et al*. (2004) A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol. Cell*. 19: 287.

(56) Koh, P.O., Undie, A.S., Kabbani, N., *et al*. (2003) Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 313-317.

(57) Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., *et al*. (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamina receptor. *J. Neurosci*. 22: 8476-86.

(58) Boekhoff, I., J. Inglese, *et al*. (1994) Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 269: 37-40.

(59) Diverse-Pierluissi, M., J. Inglese, *et al*. (1996) G protein-coupled receptor kinase mediates desensitization of norepinephrine-induced Ca^{2+} channel inhibition. *Neuron* 16.

(60) Peppel, K., I. Boekhoff, *et al*. (1997) G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *J. Biol. Chem*. 272: 25425-25428.

(61) Niculescu, A.B., Segal, D.S., Kuczenski, R., *et al*. (2000) Identifying a series of candidates genes for mania and phsychosis: a convergent funtional genomics approach. Phsyiol. Genom. 4: 83-91.

(62) Ahmed, M.R., Gurevich, V.V., Dalby, K.N., *et al*. (2008) Haloperidol and clozapine differentially affect the expression of arrestins, receptor kinases, and extracellular signal-regulated kinase activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 325: 276-283.

(63) Kim, K.M., Gainetdinov, R.R., Laporte, S.A., *et al*. (2005) G protein-coupled receptor kinase regulates dopamine D3 receptor signaling by modulating the stability of -arrestin complex. A case of autoreceptor regulation.ba receptor-filamin- *J. Biol. Chem*. 280: 12774-12780.

(64) Xu, M., Petraschka, M., McLaughlin, J.P., *et al*. (2004) Neurophatic pain activates the endogenous k opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. *J. Neuroci*. 24: 4576-4584.

(65) Mclaughlin, J.P., Mayers, L.C., Zarek, P.E., *et al* (2004) Prolonged κ oipioid receptor phosphorylation metidated by G-protein receptor kinase underlies sustained analgesic tolerance. *J. Biol. Chem*. 279: 1810-1818.

(66) Bychkov, E.R., Gurevich, V.V., Joyce, J.N., *et al*. (2008). Arrestins and two receptor kinases are upregulated in Parkinson's disease with dementia. *Neurobiol. Aging*. 29: 379-396.

(67) Sallese, M., Salvatore, L., D'Urbano, E., *et al* (2000) The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desenitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB J*. 14: 2569-2580.

(68) Iacovelli, L., Salvatore, L., Capobianco, L., *et al*. (2003) Role of G protein-coupled receptor kinase 4 and β-arrestin 1 in agonist-stimulated metabotropic glutamate receptor 1 internalization and activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem*. 278: 12433-12442.

(69) Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., *et al*. (2003) Phosphorylation-independent desensitzation of GABA(B) receptor by GRK4. *EMBO J*. 22: 3816-3824.

(70) Gurevich, E.V., Benovic, J.L., Gurevich, V.V. (2004) Arrestin2 expression selectively increases during neural diffentiation. *J. Neurochem*. 91: 1404-1016.

(71) Gainetdinov, R.R., Bohn, L.M., Walker, J.K., *et al*. (1999) Muscarinic supersensitiviy and imapirred receptor desensitization in G proteín-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron*. 24: 1029-1036.

(72) Walker, J.K, Gainetdinov, R.R., Feldman, D.S., *et al* (2004). G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol*. 286: L312-319.

(73) Liu, J., Rasul, I., Sun, Y., *et al*. (2009) GRK5 deficiency leads to reduced hippocampal acetylcholine level via impaired presynaptic M2/M4 autoreceptor desensitization. *J. Biol. Chem*. 284: 19564.19571.

(74) Fehr, C., Fickova, M., Hiemke, C., *et al*. (1997) Molecular cloning of rat G-protein-coupled receptor kinase 6 (GRK6) from brain tissue, and its mRNA expression in different brain regions and peripheral tissues. *Br. Res. Mol. Br. Res*. 49: 278-282.

(75) Gainetdinvo, R.R., Bohn, L.M., Sotnikova, T.D., *et al*. (2003) Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron*. 39: 391-303.

(76) Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2007) The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends Pharmacol. Sci.,* 28: 166-172.

(77) Raehal., K.M., Schmid, C.L., Medvedeve, I.O., *et al*. (2009) Morphine-induced physiological and behavioral responses in mice lacking G protein-coupled receptor kinase 6. *Drug Alcohol Depend*. 104: 187-196.

(78) Eijkelkamp, N., Heijnen, C.J., Elsenbruch., S., *et al*. (2009). G protein-coupled receptor kinase 6 controls post-inflammatory visceral hperalgesia. *Brain Behav. Immun*. 23: 18-26.

(79) Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., *et al*. (1992) β-arrestin2, a novel member of the arrestin/b gene family. *J. Biol. Chem*. 267: 17882-17890.

(80) Parruti, G., Ambrosini, G., Sallese, M., *et al*. (1993) Molecular cloning, functional expression and mRNA analysis of human β-adrenergic receptor kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 190: 475-81.

(81) Gurevich, E.V., Benovic, J.L., Gurevich, V.V. (2002) Arrestin2 and arrestin3 are differentially expressed in the rat brain during postnatal development. *Neuroscience* 109: 421-436.

(82) Kittel, A., Komori, N. (1999) Ultrastructural localization of β-arrestin-1 and –2 in rat lumbar spinal cord. *J. Compl. Neurol*. 412: 649-655.

(83) Fan, X.L., Zhang, J.S., Zhang, X.Q., *et al*. (2003) Differnetial rgulation of β-arrestin 1 and β-arrestin 2 gene expression in rat brain by morphine. *Neuroscience* 109: 421-436.

(84) Avissar, S., Matuzany-Ruban, A., Tzukert, K., *et al*. (2004) β-arrestin-1 levels: reduced in leukocytes of patients with depression and elevated by antidepressants in rat brain. *Am. J. Phychiat*. 161: 2066-2072.

(85) Diaz, A., A. Pazos, *et al*. (2002) Regulation of mu-opioid receptors, G-protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in the rat brain after chronic opioid receptor antagonism. *Neuroscience* 112: 345-53.

(86) Ohsawa, M., Mizoguchi, H., Narita, M., *et al*. (2003) Involvment of β-arrestin-2 in modulation of the spinal antinociception induced by β-opioid receptor agonisits in the mouse. *Neurosci. Lett*. 346: 13-16.

(87) Whistler, J.L., von Zastrow, M. (1998) Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by β-arrestin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9914-19.

(88) Kovoor, A., Celver, J.P., Wu, A., *et al*. (1998) Agonist induced homologous desensitization of β-opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy. *Mol. Pharmacol*. 54: 704-711.

(89) Haberstock-Debie, H., Kim, K.A., Yu, Y.J., *et al*. (2005) Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of β-opioid receptors in striatal neurons. *J. Neurosci*. 25: 7847-7857.

(90) Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., *et al*. (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking β-arrestin 2. *Science* 286: 2495-2498.

(91) Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R., Lin, F.T., *et al*. (2000) β-opioid receptor desensitization by β-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408: 720-723.

(92) Beaulieu, J.M. (2005) Morphine-induced μ-opioid receptor internalization: a paradox solved in neurons. *J. Neurosci*. 25: 10061-10063.

(93) Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J, Caron, M.G. (2002) Differenetial mechanisms of morpine antinociceptive tolerance revealed in barrestin-1 knock-out mice. *J. Neurosci*. 22: 10494-10500.

(94) Raehal, K.M., Walker, J.K., Bohn, L.M. (2005). Morphine effects in β-arrestin 2 knock-out mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314: 1195-1201.

(95) Elmer, G.I., Pieper, J.O., Rubinstein, M., *et al*. (2002). Failure of intravenous morpine to serve as aneffective instrumental reinforcer in dopamine D2 receptor knock-out mice *J. Neurosci*. 22: PX224.

(96) Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R., Sotnikova, T.D., *et al*. (2003). Enhanced rewarding properties of morphine, but not cocaine, in beta-arrestin-2 knock-out mice. *J. Neurosci*. 23: 10265-10273.

(97) Houslay ,M.D. (2009) Arrestin times for developing antipsychotics and β-blockers. *Cell Biol*. 2: 1-5.

5. Las hormonas tiroideas en el desarrollo del cerebro

JUAN BERNAL CARRASCO

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid.

RESUMEN

En este capítulo se hace un resumen integral del papel de las hormonas tiroideas en el desarrollo del cerebro. La hormona tiroidea activa es la triyodotironina (T3), que se origina en la glándula tiroides, y también en tejidos a partir de su precursor, tiroxina (T4). La T3 actúa a nivel de transcripción génica regulando la actividad de sus receptores nucleares, que son factores de transcripción dependientes de ligando. Durante el desarrollo, la T3 es necesaria para la expresión normal de genes que intervienen críticamente en procesos de desarrollo, especialmente migración y diferenciación neuronales. En este artículo se describen los conceptos actuales sobre el metabolismo y acción de las hormonas tiroideas en el cerebro durante el desarrollo fetal y postnatal, y el papel relativo de la secreción tiroidea materna en el desarrollo del feto. Finalmente se describen síndromes de retraso mental y alteraciones neurológicas debidos a deficiencias en la señalización de estas hormonas, incluyendo también las consecuencias de mutaciones en los receptores y en los transportadores celulares.

ABSTRACT

This chapter is a comprehensive summary on the role of thyroid hormones in development of the brain. The active thyroid hormone is tri-iodothyronine (T3), which produced by the thyroid gland, and also from its precursor thyroxine (T4) in peripheral tissues. T3 regulates gene expression by binding to nuclear recep-

tors, which are ligand-regulated transcription factors. During development, T3 is needed for the normal expression of genes critically involved in many processes, especially neuronal migration and differentiation. In this chapter we describe current concepts in thyroid hormone metabolism, including transport, and action in the developing brain during the fetal and postnatal periods. The relative role of fetal and maternal thyroid secretion during fetal development is discussed. Finally we describe the syndromes of mental retardation and neurological impairment arising as a consequence of defective thyroid hormone signalling during development, including receptor and transporter mutations.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas tiroideas son necesarias para la maduración del sistema nervioso central durante el desarrollo, y también poseen acciones en el cerebro adulto. Las enfermedades tiroideas suelen ocasionar alteraciones psiquiátricas (1, 2). Por ejemplo, el hipotiroidismo cursa con letargia, hiporreflexia y coordinación motora defectuosa. Incluso el hipotiroidismo subclínico puede estar asociado a síntomas como pérdida de memoria. En casos extremos, el hipotiroidismo puede cursar con trastornos bipolares, depresión, y pérdida de funciones cognitivas, especialmente en ancianos (3). Por otro lado, el hipertiroidismo ocasiona trastornos de ansiedad, irritabilidad e hiperreflexia. Tanto el hipotiroidismo como el hipertiroidismo pueden dar lugar a trastornos afectivos y del comportamiento, demencia, confusión, y cambios en la personalidad. La mayoría de estos trastornos son hasta cierto punto reversibles con un tratamiento adecuado, lo que indica que las enfermedades tiroideas en el adulto no dejan cambios estructurales permanentes profundos.

Durante el desarrollo, la situación es radicalmente distinta. Las hormonas tiroideas realizan determinadas acciones sólo durante ventanas específicas del desarrollo. Por lo tanto, la deficiencia hormonal, aún de corta duración puede dar lugar a alteraciones irreversibles, con daño cerebral, cuya intensidad dependerá del estadio concreto del desarrollo en el que tiene lugar la falta de hormona (4-8).

En los estudios del efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo, el modelo más utilizado ha sido la rata y, en los últimos años, el ratón, con la posibilidad que tiene éste último del desarrollo de modelos genéticos. Aunque estos modelos permiten profundizar en mecanismos pato-fisiológicos y moleculares, plantean asimismo un problema de extrapolación al organismo humano. Aunque la secuencia de eventos durante el desarrollo es similar en vertebrados, es importante señalar que existen grandes diferencias en su relación con el mo-

mento del nacimiento, en las distintas especies (9-11). El mayor crecimiento cerebral ocurre después del nacimiento tanto en rata y ratón como en el ser humano, pero los primeros nacen con un eje tiroideo menos desarrollado que el ser humano. Como referencia, se puede decir que la rata recién nacida puede compararse con un feto humano en el segundo trimestre de embarazo, y que el humano recién nacido equivaldría a una rata de 6-10 días (12).

EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LOS PROCESOS DE DESARROLLO CEREBRAL

Defectos estructurales causados por el hipotiroidismo

La revisión más detallada de los defectos estructurales presentes en el cerebro hipotiroideo de rata fue efectuada por Legrand (12). Entre los defectos se puede encontrar: Incrementos en la densidad celular de la corteza cerebral, debido a la reducción del neuropilo (13, 14). Disminución del número de células en las regiones que aumentan su celularidad después del nacimiento, como el bulbo olfatorio, y las capas granulares del giro dentado y el cerebelo (14, 15). Disminución de las interneuronas GABAérgicas en el cerebelo con acumulación de precursores (16). Disminución de interneuronas en la corteza cerebral (17). Alteración estructural de algunos tipos neuronales, como neuronas colinérgicas (18, 19), células de Purkinje (20) y neuronas piramidales de capa V (21, 22). Cambios estructurales también se observan en el hipotiroidismo de comienzo adulto, como alteraciones del número y distribución de espinas dendríticas en neuronas piramidales, pero son reversibles con el tratamiento hormonal (23, 24). Todas estas alteraciones morfológicas son consecuencia de la alteración de los siguientes procesos biológicos:

Neurogénesis

Las hormonas tiroideas participan en fases tardías del desarrollo neural, como la migración y diferenciación terminal de neuronas y glía. No se ha demostrado que actúen en la proliferación de precursores de células neurales durante la neurogénesis embrionaria, pero se han descrito algunas acciones en neurogénesis adulta. Ésta ocurre en dos regiones: la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ). La SVZ se localiza bajo la superficie de los ventrículos laterales, y genera interneuronas del bulbo olfatorio en roedores adultos. La

SGZ es adyacente a la capa granular del giro dentado, y genera células granulares. El hipotiroidismo disminuye, y la hormona tiroidea aumenta la neurogénesis en estas dos áreas (25-28).

Migración celular

Las hormonas tiroideas ejercen acciones importantes sobre la migración celular en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. Entre los mecanismos descritos están acciones en la maduración de la glía radial. La glía radial es una de las primeras células diferenciadas en el neuroepitelio, y extiende largos procesos a la superficie del cerebro embrionario, proporcionando una guía para la migración radial (29, 30). Más tarde, la glía radial se diferencia en astrocitos y células ependimarias (31). Se ha descrito un retraso de la maduración de la glía radial en el hipocampo de ratas hipotiroideas (32). Si la glía radial de la corteza también se afecta, como es probable, la deficiencia hormonal puede causar alteraciones de la migración a través de este mecanismo, aunque se han descrito alteraciones adicionales.

En la corteza cerebral las hormonas tiroideas son necesarias para la distribución ordenada de las células en las 6 capas características. Estas capas se forman debido a la migración secuencial de las células que se originan en el neuroepitelio. La deficiencia hormonal durante este período ocasiona una menor definición de las capas corticales (33-35). Uno de los posibles mecanismos moleculares es la regulación del gen *Reln*. El producto de este gen es la proteína Reelin, una proteína de la matriz celular producida por las células de Cajal-Retzius, localizadas en la capa I de la corteza (36). Las hormonas tiroideas regulan la expresión de al menos dos genes expresados en estas células, *Reln* y *Ptgds* (codifica la prostaglandina-D2-sintasa) (37, 38). Reelin es esencial para la migración ordenada y el establecimiento de las capas neocorticales. La células de Cajal-Retzius también participan en la migración neuronal en el hipocampo y en el establecimiento de conexiones sinápticas (39).

La migración neuronal en la corteza cerebral es muy sensible a las hormonas tiroideas. Incluso deficiencias menores pueden alterar la migración. Por ejemplo, en ratas preñadas, el hipotiroidismo transitorio durante los días 12-15 de gestación causa alteraciones en la posición de neuronas de la neocorteza y del hipocampo de la progenie, que se pueden observar incluso a los 40 días de edad. En paralelo, los animales afectados presentan convulsiones audiogénicas (40). La deficiencia tiroidea moderada durante la preñez ocasiona también ectopias neuronales en el cuerpo calloso (41).

En el cerebelo, las hormonas tiroideas participan en la fase final de la migración de las células granulares de la capa germinal externa a la capa granular interna. En roedores este proceso se completa ya a día postnatal 20 (P20), desapareciendo la capa germinal externa. La células granulares, que proliferan en la capa germinal, comienzan su migración cuando salen del ciclo celular. El principal factor en este control es Sonic Hedgehog, producida por las células de Purkinje. Es posible que las hormonas tiroideas participen en la producción de Sonic, o que faciliten la acción del mismo. En roedores una alteración muy característica del hipotiroidismo neonatal es el retraso en la migración en el cerebelo, con persistencia de la capa germinal externa (42).

Mielinización

El hipotiroidismo causa un retraso en la mielinización (43-45) mientras que el hipertiroidismo la acelera (46). El número de axones mielinizados está muy disminuido de forma permanente tras el hipotiroidismo neonatal. Los pocos axones que se conservan mielinizados poseen en cambio un grosor normal de la mielina, pero con sutiles alteraciones ultraestructurales. Estos efectos se deben a las acciones de las hormonas tiroideas sobre la diferenciación de los oligodendrocitos, que son las células productoras de mielina. En ausencia de hormona tiroidea la diferenciación de oligodendrocitos está retrasada y, aunque se recupera in vivo, la mielinización queda permanentemente afectada (19, 35). Otro factor que puede dar lugar a deficiencias en la mielinización axonal es el menor diámetro de los axones en ausencia de hormona, puesto que los axones mielinizan cuando alcanzan un tamaño crítico (47).

METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN EL CEREBRO

Las concentraciones de T4 (precursor de T3) y T3 (la hormona activa) en el cerebro tienden a mantenerse constantes gracias a mecanismos reguladores muy eficientes, en los que participan la secreción tiroidea, el transporte al cerebro, las desyodasas y, en el caso particular del feto, el transporte transplacentario. Mientras que la T3 se equilibra rápidamente entre el plasma y tejidos como hígado o riñón, el cerebro lo hace con más dificultad, y requiere dosis más elevadas que hígado o riñón. En cambio, cuando se administra T4, la T3 cerebral (procedente de conversión de T4 en T3, como veremos más adelante) se normaliza mucho más eficientemente que cuando se administra T3 (48, 49). Las

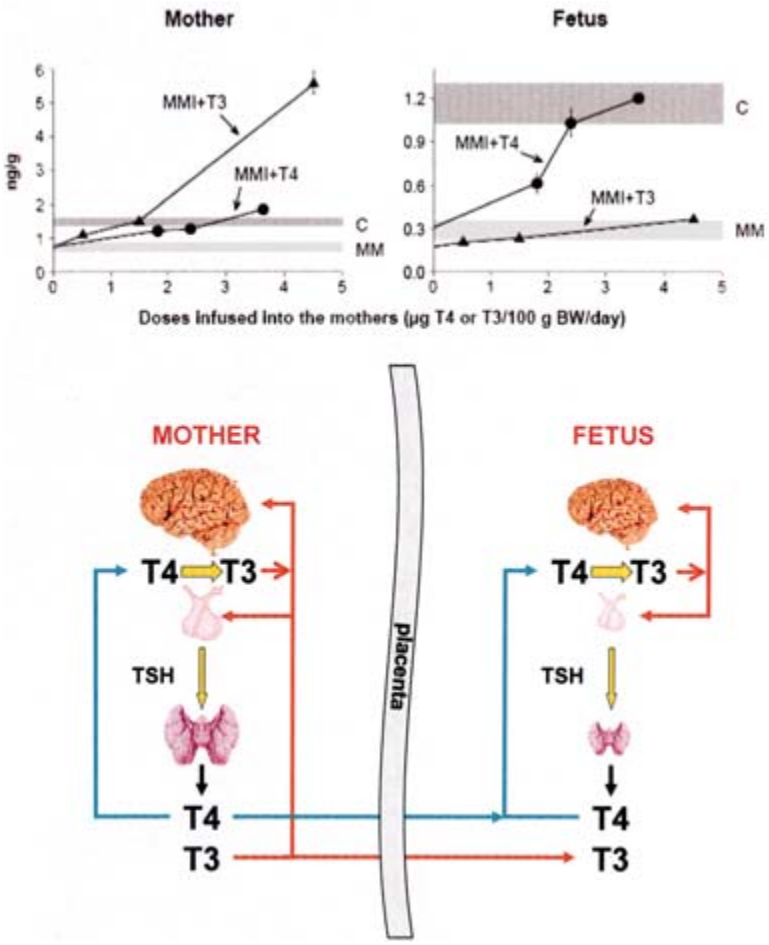


FIGURA 1. *El panel superior muestra las concentraciones de T3 en el cerebro materno y fetal tras la administración de T4 o de T3 a la madre, en una situación en la que se ha bloqueado la síntesis hormonal de la madre y del feto mediante la administración de Metil-mercapto-imidazol (MMI). Se observa que en la madre, la T3 se acumula en cerebro tras la administración de T4 o de T3, con la diferencia de que las concentraciones obtenidas tras la administración de T4 son más estables. En el cerebro fetal, la T3 no se acumula cuando se administra T3 a la madre a pesar de que esta hormona atraviesa la placenta. En cambio, sí lo hace cuando se administra T4. (Datos de Calvo R et al, J Clin Invest. 86:889-99, 1990). El panel inferior explica este mecanismo. En la madre, la T3 cerebral procede de la T3 circulante y de la conversión de T4 en T3. En el feto, sólo la T4 es capaz de proporcionar T3 al cerebro.*

concentraciones de T3 que se alcanzan en el cerebro cuando se administra T4 se mantienen muy constantes aún cuando la dosis de T4 administrada sea excesiva, lo que evita un exceso de T3.

Existe una diferencia importante en el transporte de las hormonas tiroideas al cerebro, entre la vida fetal y la postnatal. Cuando se administra T4 a ratas preñadas en condiciones en las que se mantiene las glándulas tiroideas materna y fetal bloqueadas, se encuentra T3 en el cerebro fetal, lo que indica que la T4 cruza la placenta y es capaz de llegar al cerebro fetal y producir T3. En cambio, cuando se administra T3, aunque es capaz de pasar la placenta y llegar a otros tejidos (50), no se detecta en cerebro, posiblemente por falta de transportadores específicos en la barrera hematoencefálica. En cambio, en ratas postnatales, tanto la T4 como la T3 son capaces de llegar al cerebro. En ausencia de desyodasa tipo 2 (D2, ver la sección correspondiente), la concentración de T3 en la corteza es el 50% de lo normal (51).

Fuentes de hormona tiroidea para el feto

Antes del comienzo de la función tiroidea fetal, la única fuente de hormona tiroidea para el feto es la procedente de la madre. Las hormonas tiroideas está ya presentes en el embrión de rata a los 3 días de la implantación uterina (52-57). Durante el desarrollo fetal, la proporción de hormona originada en el feto aumenta progresivamente, pero en la rata a término, se calcula que el 17,5% de la T4 es de origen materno (58). En el humano, la T4 ya está presente en el fluido celómico en la 6.ª semana de gestación (59). En el cerebro fetal humano, T4 y T3 están presentes ya en la semana 10 de gestación (60). El 30-40% de la T4 presente en la sangre de neonatos a término es de origen materno (61).

Expresión y distribución regional de las desyodasas

Las desyodasas son enzimas que catalizan la pérdida de átomos de yodo de las yodotironinas. La desyodación en el anillo externo (posición 5') está catalizada por las desyodasas D1 y D2, que dan lugar a T3 a partir de T4 o T2 a partir de rT3. La desyodación en el anillo interno (posición 5) está catalizada por la D3, que origina T2 a partir de T3, y rT3 a partir de T4. En cerebro se expresan D2 y D3 (62).

Desyodasa tipo 2

En los tejidos que expresan D2, como cerebro, hipófisis y grasa parda, el 50% o más de la T3 procede de T4 (63, 64). En el cerebro adulto casi el 80% de la T3 nuclear se forma a partir de la T4 cerebral (65). Se puede detectar ac-

tividad D2 en el cerebro fetal y aumenta progresivamente a lo largo del desarrollo postnatal hasta niveles adultos (66) (67). Al mismo tiempo, la T3 cerebral aumenta 18 veces (67). La actividad D2 aumenta en el hipotiroidismo, y es muy sensible a la administración de T4 (68). En la deficiencia de yodo, el incremento de actividad D2 tiende a mantener las concentraciones de T3 normales, a pesar de la reducción de T4 en plasma y cerebro (69). La principal regulación de la actividad D2 ocurre a nivel post-traduccional, y está mediada por el citoesqueleto de actina (70-72) y el sistema ubiquitina-proteasoma (73, 74). De forma adicional, pero en menor medida, la D2 se regula también a nivel de mRNA (75-78).

La mayor expresión de D2 ocurre en el hipotálamo (79), en células gliales especializadas llamadas tanicitos, localizadas en la pared del tercer ventrículo (78-80). Esta células extienden largos procesos al hipotálamo adyacente y la eminencia media (81) terminando en capilares y terminales axónicos. Los tanicitos podrían estar implicados en la captación de T4 de los capilares de la eminencia media y el hipotálamo basal, o desde el líquido cefalorraquídeo. La T4 captada por los tanicitos daría lugar a T3 por la acción de la D2. Esta T3, formada en los tanicitos, podría ser liberada al LCR y desde allí alcanzar otras regiones, o a los núcleos hipotalámicos. Por ejemplo, la T3 podría alcanzar el núcleo paraventricular (PVN), para regular la producción de TRH. La T3 producida en los tanicitos podría participar en la regulación de la secreción de TSH hipofisaria a través de un mecanismo directo tras la liberación a los vasos porta (82).

La D2 también se expresa en astrocitos por todo el cerebro (77, 80). Análisis genómicos han demostrado que el gen que codifica D2 es uno de los 50 genes más específicos de los astrocitos (83).

La expresión de D2 en los astrocitos contrasta con la expresión del receptor de T3, que es principalmente neuronal (84, 85). Basándonos en estos datos hemos planteado un modelo (Fig. 2) por el que los astrocitos captan T4 de la sangre, la convierten en T3 y las liberan en el espacio extracelular donde es captada por las neuronas, en una cooperación glía-neurona similar a otros modelos (86). En la cóclea, también la D2 se localiza en el tejido conectivo (87) mientras que el receptor de T3 se expresa en el epitelio sensorial y el ganglio espiral (87-89).

Los ratones knock out de D2 (51) presentan una reducción de las concentraciones de T3 similares a las de los ratones hipotiroideos; sin embargo, estos ratones poseen mínimas alteraciones neurológicas. Los tests de locomoción, memoria, ansiedad, etc., son totalmente normales, o revelan mínimas alteraciones. La expresión de algunos genes diana de T3, como *Nrgn* (RC3) está alterada en ratones hipotiroi-

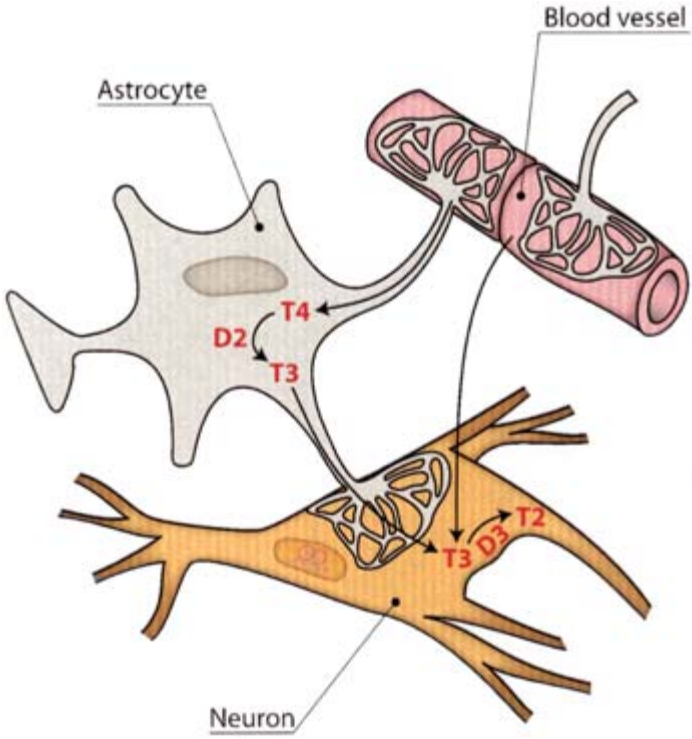


Figura 2. *Entrada de la hormona tiroidea al cerebro a través de la barrera hematoencefálica (BBB). La T3 puede llegar a las neuronas a través de dos vías: directamente de la sangre, en un transporte de transcitosis facilitado por la proteína Mct8. De forma indirecta, a partir de la T4 circulante y su conversión a T3 en los astrocitos. Para ello, la T4 pasa la barrera hematoencefálica también mediante un procedimiento de transcitosis, facilitado por Mct8/MCT8, y también por Oatp14. Es posible que el cerebro humano no exprese OATP14 en la barrera, por lo que la llegada de T3 a las neuronas dependería exclusivamente de la T4 que llega a los astrocitos.*

deos pero no en ratones knock out de D2, a pesar de presentar concentraciones cerebrales de T3 similares. La causa de esta discrepancia no se conoce, pero existe la posibilidad de que la T3 generada en los astrocitos tenga acciones sutilmente diferentes de la T3 que llega a las neuronas directamente a partir del plasma. Los ratones knock out para D1 y D2, que no son capaces de formar nada de T3 a partir de T4, tampoco tienen alteraciones neurológicas, poseen concentraciones normales de T4 y T3 en plasma, disminución de T3 en cerebro y expresión de *Nrgn* reducida en la corteza (90). Es decir, aunque se considera que la D2 juega un papel importante en la regulación de las concentraciones de T3 en cerebro, los datos de los animales knock out para D2 o D1+D2 revelan una sorprendente capacidad de regulación, y mantenimiento de funciones dependientes de hormona tiroidea.

Desyodasa tipo 3

La D3 inactiva la hormona tiroidea mediante desyodación en el anillo interno (91). La actividad D3 es muy elevada en la placenta y en tejidos fetales y disminuye después del nacimiento (66, 92-94). En la placenta humana la actividad D3 es 200 veces más elevada que la de D2 en todas las etapas de gestación (95, 96). In vivo, la expresión de D3 es típica de neuronas (97) (98), aunque in vitro se puede estimular su expresión en astrocitos tras la adición de factores de crecimiento (99-101).

Se cree que la D3 juega un papel importante en el control de la concentración de T3 en los tejidos durante el desarrollo. Por ejemplo, en las fases iniciales de la metamorfosis, la expresión de D3 impide la acción de hormona tiroidea en renacuajos (102-105). En mamíferos la D3 placentaria controla la transferencia placentaria de hormona de la madre al feto (106). La expresión de D3 es muy elevada en el útero en el sitio de implantación y en las células epiteliales que bordean la cavidad fetal (107). En la rata recién nacida existe una expresión muy elevada y restringida a determinadas regiones como el núcleo del lecho de la estría terminal o otras áreas que tienen en común el de participar en la diferenciación sexual del cerebro (97, 108). Esto sugiere que la D3 podría estar frenando la acción de T3 en determinadas regiones durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro (109). Los ratones deficientes de D3 (110, 111) Tienen alteraciones profundas de la economía tiroidea, con elevación de los niveles de T4 y T3 durante el período postnatal. Esto produce una situación de hipermetabolismo que progresa después hacia un estado de hipotiroidismo central que se mantiene en el adulto, lo que se refleja en la expresión de genes cerebrales.

Transportadores

Las hormonas tiroideas atraviesan la membrana celular usando diversos transportadores de membrana. Este concepto, discutido durante mucho tiempo, recibió confirmación definitiva tras la identificación de un síndrome neurológico producido por mutaciones en uno de estos transportadores, el MCT8 (transportador de monocarboxilatos 8, gen *SLC16A2*) (112, 113). Los transportadores de hormona tiroidea pertenecen a varias familias entre ellas los transportadores de aniones orgánicos dependientes de Na+ (NCTP) o los transportadores de polipéptidos independientes de Na+ (OATP), los transportadores heterodiméricos de aminoácidos (HAT) LAT-1 y LAT-2, y los transportadores de monocarboxilatos, como el ya citado MCT8 y el MCT10 (114).

MCT8 y MCT10 son transportadores específicos de yodotironinas, con una mayor afinidad por 3 que por T4. El Mct8 de ratón se expresa muy abundantemente en los plexos coroideos, y también en tanicitos y en neuronas. Datos recientes han demostrado que la expresión de Mct8 en la barrera hematoencefálica tiene mucha importancia funcional (115, 116). El Oatp se expresa en los microcapilares de la barrera hematoencefálica y en los plexos coroideos (117) y posee mayor afinidad por T4 que por T3. El modelo prevalente es que la T4 se transporta a través de la barrera hematoencefálica mediante Mct8 y Oatp, es captada por los astrocitos y desyodada a T3 por la acción de D2. La T3 formada pasaría a las neuronas a través de Mct8 u otros transportadores que también se expresan en la membrana neuronal. La T3 circulante pasa la barrera exclusivamente a través de Mct8. En ausencia de Mct8, la T3 no puede pasar al cerebro, mientras que la T4 sí puede hacerlo a través de Oatp. Se piensa que la barrera hematoencefálica humana sólo expresa MCT8, por lo que en las mutaciones de este transportador, estaría restringido el paso de T4 y de T3, en contra de lo que ocurre en roedores, en los que Oatp también se expresa en la barrera.

RECEPTORES DE HORMONA TIROIDEA EN CEREBRO

Los receptores de hormona tiroidea se expresan en el cerebro de rata a partir de los días 13.5-14 después de la concepción, es decir varios días antes del comienzo de la función tiroidea, que ocurre a partir del día 17-18. La capacidad de unión a T3 alcanza un máximo en el día postnatal 6 (118-120). La ocupación del receptor por la hormona aumento en paralelo a la concentración de T3 total y libre en el plasma, con un máximo en el día 15, en el que la saturación es del 50-60% (121). En cuanto a las distintas isoformas, todas se expresan en cerebro, aunque predomina TRα1 (84, 85, 122). La proteína TRβ1 constituye el 80% del receptor presente en cerebro de rata (123). Aunque TRβ1 está distribuido por todo el cerebro, algunas células por ejemplo, las células de Purkinje del cerebelo expresan predominantemente TRβ.

En cerebro humano, el receptor de T3 está ya presente en el feto de 10 semanas (60, 124). La concentración de receptor aumenta progresivamente y alcanza un máximo a las 16-18 semanas, en coincidencia con el período de proliferación de neuroblastos (125). En estos estadios del desarrollo llega suficiente T3 como para saturar un 25% de los sitios receptores (126) en cerebro, mientras que en otros órganos la expresión del receptor no se acompaña de un incremento de la ocupación por T3. Esto se debe a que durante el período fetal la T3 se origina en cerebro a partir de la T4, en etapas en las que hay muy poca

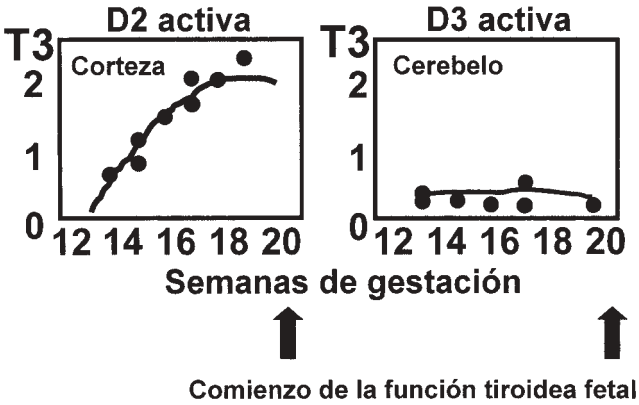


FIGURA 3. *Concentraciones de T3 en la corteza cerebral y el cerebelo fetal humano. Durante el segundo trimestre, la corteza posee una actividad D2 alta, mientras que en cerebelo la actividad D2 es baja, mientras la actividad D3 es alta. Esto facilita la acumulación de T3 en la corteza, manteniéndose bajas las concentraciones en el cerebelo. (A partir de datos de Kester et al, J Clin Endocrinol Metab. 89:3117-28, 2004).*

T3 circulante en el feto. El origen de esta T3 es la D2, que experimenta un notable incremento el cerebro fetal durante el segundo trimestre (127). Es interesante constatar que este incremento ocurre en algunas regiones como la corteza cerebral, mientras que el cerebelo se mantiene libre de T3 debido a la falta de expresión de D2 y a la presencia de D3 (Fig. 3). Es decir, en las mismas etapas del desarrollo, la expresión de las deyodasas está encaminada a facilitar la acción de las hormonas tiroideas en unas regiones como la corteza cerebral, y a impedirla en otras como el cerebelo. El hecho de que el sustrato de D2 en la corteza fetal sea la T4, explica la importancia que tiene esta hormona, que procede de la madre, así como las alteraciones en el desarrollo ocasionadas por la hipotiroxinemia materna.

MECANISMOS DE ACCION DE HORMONA TIROIDEA EN CEREBRO

Regulación de la expresión génica en cerebro por hormona tiroidea

Dado que los receptores de T3 son factores de transcripción nuclear, la hormona tiroidea ejerce la mayor parte de sus acciones mediante la regulación de la expresión génica. Se han identificado muchos genes regulados por la hormona tiroidea en cerebro, especialmente en la etapa postnatal en la rata que pue-

den explicar la acción de la hormona tiroidea en procesos del desarrollo (128-132).. La mayoría de estos genes son sensibles a hormona tiroidea sólo durante ventanas específicas del desarrollo, y no son sensibles a la hormona en la edad adulta. Existen también genes regulados por la hormona tiroidea en la edad adulta (133) y en el cerebro fetal (Morte y cols, Endocrinology, en prensa).

Período fetal

Aunque se ha considerado durante mucho tiempo que el cerebro fetal no es sensible a hormona tiroidea en términos de regulación de la expresión génica (134), sin embargo se han descrito algunos genes sensibles a T3 en cultivos de neuronas fetales y en cerebro de rata (135-138). Recientemente hemos identificado muchos genes diana de hormona tiroidea en el cerebro fetal, ocupando un papel importante Camk4 y genes relacionados, así como genes de citoesqueleto como los neurofilamentos (Morte y cols, Endocrinology, en prensa).

Período postnatal

La mayoría de las acciones de las hormonas tiroideas se han estudiado durante el período postnatal en la rata, en la que existe un máximo de sensibilidad en las primeras 2-3 semanas de vida. Durante este período la hormona tiroidea ejerce acciones importantes en la mielinización, desarrollo del cerebelo, giro dentado y cóclea, y diferenciación terminal de oligodendrocitos y neuronas, formación de sinapsis y arborización dendrítica. El período correspondiente en el ser humano comprende entre la semana 20 de gestación hasta los primeros 2 años de vida.

Genes diana de hormona tiroidea en mielinización

La hormona tiroidea actúa sobre la diferenciación de oligodendrocitos, por lo que prácticamente todos los genes de estas células se alteran en la deficiencia de hormona. Algunos como la proteína básica de mielina son dianas directas de la hormona, pues poseen elementos de respuesta en el promotor, pero la regulación principal es a través de la diferenciación de oligodendrocitos. (139-142). El efecto de la hormona se media a través de TRa1 y del factor de transcripción E2F1 (143-145).

Genes mitocondriales

La hormona tiroidea ejerce importantes acciones sobre la mitocondria, e influencia la transcripción del DNA mitocondrial (146-148). Se han descrito genes mitocondriales regulados por la hormona tiroidea in vivo como RNAs 12S y 16S, citocromo C oxidasa (149, 150), subunidad 3 de NADH deshidrogenasa (151), y un receptor importador de proteína (37).

Genes de migración celular

Ya hemos hablado anteriormente de los efectos de la hormona tiroidea en la migración neuronal, que se ejercen probablemente mediante el control de la expresión de genes como la *Rln* y *Dab1*(39, 152). Las hormonas tiroideas también ejercen un control negativo en la expresión de proteínas de matriz extracelular. Estas proteínas poseen múltiples funciones, entre ellas la migración, y además crecimiento de axones, morfología del cono axonal, fasciculación etc. Entre ellas, la Tenascina C, Laminina, L1, y NCAM (153-156).

Genes de diferenciación neuronal

La hormona tiroidea controla la expresión de genes implicados en diferenciación terminal, como reguladores del ciclo celular, proteínas de citoesqueleto, neurotrofinas, y proteínas de la matriz. Entre los reguladores del ciclo celular, E2F1, p53, ciclinas, e inhibidores de kinasa dependientes de ciclinas (157-159). Como se ha mencionado anteriormente, E2F1 está implicado en diferenciación de oligodendrocitos (143).

La morfología de las células neurales viene determinada por el citoesqueleto, que consiste en microtúbulos (tubulina), microfilamentos (actina) y filamentos intermedios, específicos de neurona (neurofilamentos), glia (GFAP), o células inmaduras (vimentina, nestina). La hormona tiroidea regula la expresión de Tubulinas a1 y a2, así como de Tubulina b4 (160, 161). Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) también dependen de hormona tiroidea, especialmente MAP2 sobre la que se ejerce un control post-transcripcional (162). La hormona tiroidea también interviene en la maduración de la proteína Tau mediante ayuste («splicing») alternativo del mRNA (163).

Algunos de los efectos de las hormonas tiroideas sobre diferenciación neuronal se deben al control de la expresión de neurotrofinas y sus receptores como NGF (18), trkA y $p75^{NTR}$ (164). Algunos de los efectos en el cerebelo se deben al control de la expresión de BDNF y Neurotrofina 3 (165).

Otros genes implicados en señalización celular

La hormona tiroidea controla la expresión de Neurogranina (Nrgn, RC3) (156). Esta proteína es un sustrato de kinasa C que une calmodulina en ausencia de Ca2+ y regula la disponibilidad de Calmodulina libre, en relación con la señalización por iones Ca2+ (192). Participa en la señalización a través de receptores de glutamato (166). El gen Nrgn se regula de forma directa por T3 a través de un elemento de respuesta situado en el primer intrón (167).

La proteína Rhes, o Rasd2 (168, 169) es una proteína de la familia Ras que interviene en la señalización por receptores de membrana acoplados a proteínas G (170). La T3 también regula la expresión de *Tubby*, un gen de hipotálamo que también actúa a través de proteínas G (171, 172). Otros genes implicados en señalización a través de proteínas G son regulados por T3 en el núcleo estriado (133).

Factores de transcripción y otros reguladores

La regulación de la expresión de proteínas implicadas en transcripción, maduración y estabilidad de mRNA es muy importante en la regulación génica. El factor de transcripción NGFI-A (Krox-24, Egr-1, Zif-268) es regulado por la T3 a nivel de promotor (173, 174). La T3 también regula la expresión de otros factores de transcripción como BTEB (175, 176), RORa (177), Hairless (178), (179). Además de factores de transcripción la hormona tiroidea regula la expresión de factores que intervienen en la maduración de mRNA (180),

ASPECTOS CLÍNICOS

Las causas más importantes de deficiencia de hormona tiroidea durante el desarrollo son la deficiencia de yodo, los defectos congénitos de la glándula tiroides, y el hipotiroidismo materno y/o fetal. Además, existen situaciones como la hipotiroxinemia, definida como la disminución de T4 en presencia de T3 y

TSH normales que, en embarazadas puede causar trastornos en el desarrollo cerebral del feto. Menos frecuentes, pero de una gran importancia clínica, son las mutaciones del receptor TRb (THRB) y las mutaciones del transportador MCT8.

Deficiencia de yodo. Cretinismo Endémico

Las necesidades diarias de yodo para un adulto son del orden de 150 μg, aumentando en el embarazo y lactancia a 250 μg (181, 182). La deficiencia de yodo ocasiona un amplio espectro de alteraciones, conocidas colectivamente como «Trastornos por deficiencia de yodo» (183). Entre estos trastornos, hay una mayor incidencia de abortos, aumento de la mortalidad perinatal, bocio neonatal, hipotiroidismo, alteraciones psicomotoras, cretinismo, etc.

La situación clásica de la deficiencia de yodo endémica se conoce como cretinismo, que ha sido endémica en muchas regiones del planeta, incluido nuestro país (tema tratado magistralmente por Luis Buñuel en su película «Tierra sin pan», sobre Las Hurdes, en 1932). Existen dos formas clásicas de cretinismo, llamadas cretinismo neurológico y mixedematoso, respectivamente, descritas por McCarrison (184) en los Himalayas y en Papua-Nueva Guinea. La principal diferencia es la presencia de alteraciones neurológicas en el cretinismo de este nombre, y de hipotiroidismo en el cretinismo mixedematoso, sin síntomas de afectación neurológica. En ambos casos hay retraso mental que puede ser profundo. En el cretinismo neurológico, la glándula tiroides es normal, pero el retraso mental severo se acompaña de sordomudez y de un síndrome neurológico que afecta a los ganglios basales, con diaplejía espástica que afecta a los miembros inferiores (185). El cretinismo mixedematoso (186) se caracteriza por la presencia de hipotiroidismo, con enanismo, pobre desarrollo sexual y anomalías craneofaciales. El retraso mental es menos profundo que en el cretinismo neurológico. En las regiones afectadas es frecuente ver una combinación de las dos formas.

Estas dos formas de cretinismo reflejan el diferente momento en el desarrollo fetal en el que se produce la deficiencia de la hormona tiroidea que llega al cerebro del feto. En el cretinismo neurológico la deficiencia ocurre durante el segundo trimestre de gestación que, como hemos visto anteriormente es una etapa crítica, en el comienzo de la homeostasis tiroidea fetal. La causa del síndrome es la deficiencia de yodo profunda de la madre gestante, con disminución de la T4 que le puede llegar al feto, en una etapa del desarrollo en el que la función tiroidea fetal aún no está desarrollada. A lo largo del segundo trimestre, el cerebro del feto expresa ya los receptores de T3, y es dependiente de la hormona tiroidea materna. En el cretinismo mixedematoso la función tiroi-

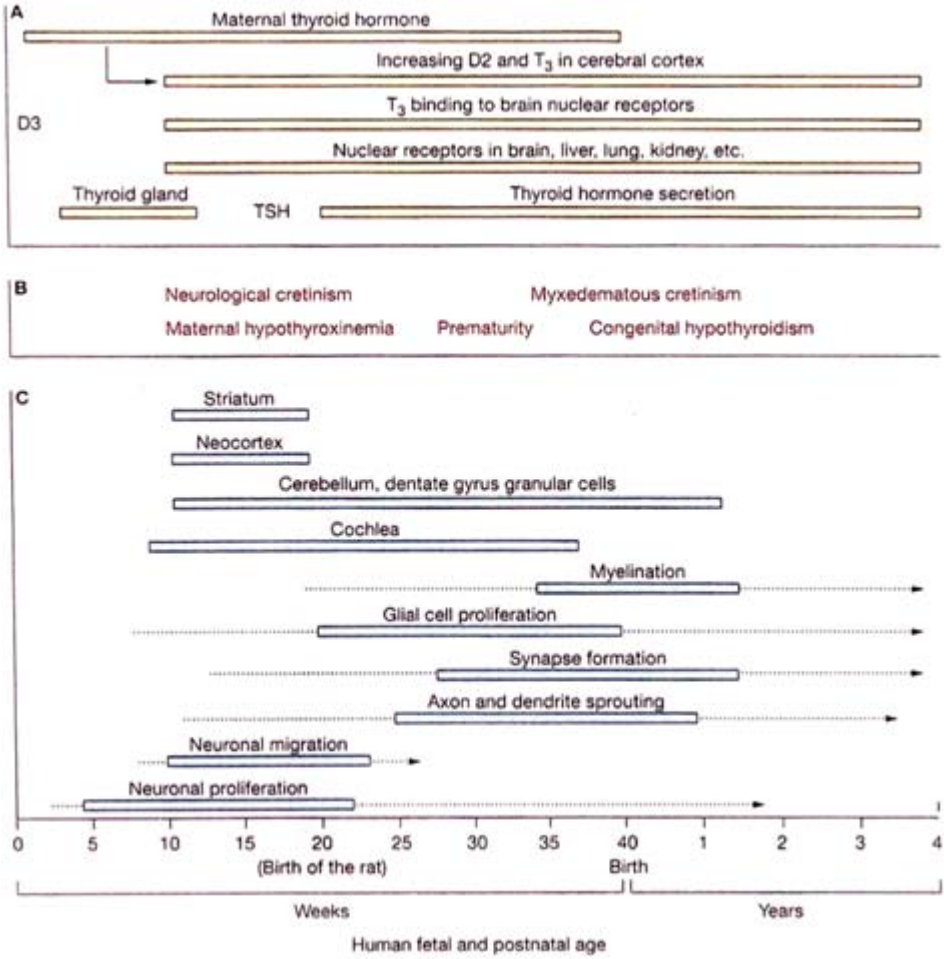


Figura 4. *Relación entre el desarrollo del sistema nervioso central en humanos (C) el desarrollo de procesos relacionados con la función tiroidea (A) y el momento crítico en el que la deficiencia de hormona tiroidea ocurre en los síndromes indicados (B). La comparación con los estadios correspondientes en la rata se ha establecido mediante la línea vertical que indica la posición aproximada de la rata recién nacida. Modificado de Bernal, Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 3:249-259, 2007.*

dea materna es suficiente para proteger al feto durante la primera mitad de la gestación, pero se produce un fallo de la glándula tiroides del feto y neonato con hipotiroidismo. El fallo tiroideo, que en muchos casos deriva a destrucción total de la glándula, se debe a una combinación de falta de yodo y bociógenos de la dieta, como el tiocianato.

Hipotiroidismo Congénito

Los defectos congénitos de la glándula tiroides tienen una frecuencia de 1 en 3.500 recién nacidos (187). Estos defectos se detectan precozmente en los programas de barrido neonatal, y el tratamiento inmediato consigue prevenir eficientemente el retraso mental. La causa más frecuente de hipotiroidismo congénito es la disgenesia glandular (ectopias y agenesia) y los errores innatos de la síntesis hormonal. En un pequeño porcentaje de casos de disgenesia se han descrito mutaciones en genes que participan en la embriogénesis tiroidea (188), pero en la mayoría de casos se deben a mecanismos no mendelianos, con participación de múltiples genes (189). Se ha descrito un caso con receptor de TSH truncado (190). El tratamiento precoz tras la detección en el barrido neonatal es muy eficaz, aunque algunos casos presentan daño cerebral mínimo (191, 192).

Hipotiroidismo e hipotiroxinemia durante la gestación

Las hormonas tiroideas de la madre pasan al feto, y juegan un papel importante antes y después del comienzo de la función tiroidea fetal (193). A término, el 50% de la T4 fetal es de origen materno (61). En los casos de hipotiroidismo materno, el desarrollo cerebral del feto puede estar afectado. En casos extremos en los que hay hipotiroidismo materno y fetal, los niños sufren secuelas neuromotoras y sordera sensorial permanente. Esto ocurre por ejemplo en casos de deficiencia de Pit-1 (194), o en los casos con títulos elevados de anticuerpos bloqueantes de la función tiroidea (195, 196). El hipotiroidismo materno, en presencia de una función tiroidea fetal normal es también perjudicial para el desarrollo cerebral del feto (197, 198) y, si ocurre en el segundo trimestre puede haber una disminución de hasta 4 puntos en el IQ, con defectos de atención, lenguaje, etc. (198).

La hipotiroxinemia materna es la disminución de T4 en suero sin hipotiroidismo. Es relativamente frecuente en embarazadas, en las que durante el primer trimestre se produce normalmente una estimulación tiroidea por los niveles elevados de hCG (gonadotrofina coriónica). La estimulación tiroidea ocasiona un incremento de T4 que satisface las necesidades del feto. Ahora bien, este incremento no se produce si existe deficiencia relativa de yodo (199). El embarazo aumenta las necesidades de yodo, muy por encima de las necesidades de una persona adulta. Por ello, la hipotiroxinemia es relativamente frecuente incluso en regiones en las que la ingesta de yodo es adecuada para un adulto. La hipotiroxinemia se asocia a alteraciones neurológicas en niños (200, 201), y

a una mayor frecuencia del Síndrome de falta de atención e hiperactividad (202). Mientras que la incidencia de hipotiroidismo en embarazadas es del 2,5%, la hipotiroxinemia puede llegar al 30% (193, 203, 204). Por estas razones, se recomienda suplementar con yodo (200 μg/día) a todas las embarazadas (181). Un estudio reciente realizado en Alicante por Berbel y cols (205) ha demostrado que la suplementación con yodo es esencial antes del segundo trimestre de gestación. En nuestro país existen preparados farmacológicos que contienen yodo y ácido fólico, que deberían ser administrados a todas las mujeres que contemplan un embarazo, o lo antes posible una vez embarazadas, y a lo largo de todo el embarazo y la lactancia.

Prematuridad

Los bebés prematuros presentan hipotiroxinemia en un 85% de casos, de varias semanas de duración (206, 207), lo que es debido fundamentalmente a la interrupción del aporte materno, y a la inmadurez del eje tiroideo fetal. Se ha discutido si esta situación es «fisiológica», o si los neonatos prematuros deberían ser tratados con T4 para conseguir niveles hormonales similares a fetos de la misma edad (208-210). La hipotiroxinemia de los prematuros se ha correlacionado con un mayor riesgo de alteraciones neurológicas, (211), parálisis cerebral (212) y daño de la sustancia blanca (213). Aun no se ha establecido con rotundidad la efectividad del tratamiento de los prematuros con (214-216), estudios recientes sugieren que puede ser beneficioso, y se están desarrollando protocolos con este objeto.

Mutaciones del transportador celular de hormonas tiroideas

Entre los transportadores de hormona tiroidea identificados en la membrana celular, el más relevante desde el punto vista clínico es MCT8, una proteína de 12 dominios transmembrana. Esta proteína está codificada por el gen SLC16A2, localizado en el cromosoma X. Las primeras mutaciones de este gen se describieron por los grupos de Refetoff (112) y de DeVisser (113), a los que siguieron otros casos (217-219). Los pacientes presentan retraso mental ligado al cromosoma X, retraso profundo del desarrollo, daño neurológico severo, y alteraciones de las hormonas tiroideas circulantes: elevación de T3 y disminución de T4 y rT3. La TSH es normal o ligeramente elevada. El daño neurológico se manifiesta por falta de desarrollo del lenguaje, hipotonía truncal, con control de-

ficiente de la cabeza, nistagmo rotatorio, movimientos distónicos, y discinesias paroxísticas (220). La hipotonía evoluciona progresivamente a espasticidad y tetraplejia.

El síndrome de Allan-Herndon-Dudley (OMIM 300523), descrito hace mas de 40 años era de etiología desconocida, hasta que recientemente se ha encontrado que se debe a mutaciones de MCT8 (221). Se piensa que el síndrome es debido al defecto del transporte de T3 a neuronas en períodos críticos del desarrollo fetal (222, 223). Se han descrito ratones knock out para Mct8, que presentan las mismas alteraciones del metabolismo de las hormonas tiroideas que los pacientes, pero no las alteraciones neurológicas (224, 225). Por tanto estos ratones son sólo un modelo parcial de la enfermedad.

Datos recientes sugieren que la mutación de Mct8 restringe la entrada de T3 a través de la barrera hematoencefálica (115, 116). La diferencia entre las manifestaciones clínicas entre los humanos y los ratones knock out podría deberse a la falta en humanos de transportadores alternativos que sí estarían presentes en la barrera hematoencefálica de roedores 115.

Mutaciones del receptor de T3

De los dos genes que codifican receptores de T3 (*THRA* para TRα y *THRB* para TRβ en humanos, *Thra* y *Thrb* en roedores), sólo se han identificado mutaciones en *THRB* como causantes del síndrome de resistencia a hormona tiroidea (RTH) (226). Los pacientes presentan defectos del aprendizaje, disminución de IQ, y aumento de la incidencia del síndrome de hiperactividad y falta de atención. Existen modelos animales con mutaciones o delecciones del gen *Thrb* (227). Estos ratones han revelado un papel importante de TRβ en la maduración de la cóclea, y de los fotorreceptores. (228, 229). En ratones que expresan TRβ mutantes con actividad dominante negativa (es decir que inhibe la actividad del producto del alelo normal) se observan alteraciones del cerebelo similares a la del hipotiroidismo profundo (230).

En cambio no se han descrito mutaciones de *THRA* en humanos, posiblemente porque al no estar implicado TRα en la regulación de TSH, las posibles mutaciones cursarían con niveles normales de TSH y hormonas tiroideas, por lo que el cuadro clínico que presentasen los posibles pacientes no se relacionarían con las hormonas tiroideas y sus receptores. Así pues, es de interés conocer qué tipo de alteraciones clínicas presentarían dichos pacientes. Este problema se ha abordado obviamente en ratones a los que se ha introducido mutaciones

en el *Thra*. De estos estudios ha emergido un concepto de gran interés: la delección del gen, que da lugar a ausencia del receptor, no es equivalente al hipotiroidismo, aun descartando la posible compensación por TRβ. La ausencia de hormona, en presencia del receptor hace que se manifieste una propiedad intrínseca de esta molécula que consiste en ser un potente represor. Naturalmente, en ausencia del receptor esta propiedad no se manifiesta. Las alteraciones que presenta el cerebro "hipotiroideo" son debidas más a la actividad represora del receptor en ausencia de su ligando T3, que a la falta de señalización de esta hormona en ausencia de su receptor. Debido a ello, la ausencia de TRα en ratones origina un fenotipo menos grave que la ausencia de hormona (231, 232).

En cambio, la expresión en ratones de un receptor mutado, incapaz de unir hormona, y que conserva su capacidad de unión a DNA y, por tanto, su actividad represora intrínseca, produce retraso del crecimiento (233), disminución del consumo de glucosa cerebral (234), retraso en el desarrollo del cerebro y alteraciones neurológicas (235-237) y, en animales adultos un estado de profunda ansiedad, sensible al tratamiento con altas dosis de T3 cuando el receptor mutado conserva algún vestigio de unión de la hormona (236). Las consecuencias fenotípicas son heterogéneas dependiendo de la mutación (238-240).

Un concepto nuevo

Puesto que los receptores de T3 poseen actividad transcripcional independiente de la hormona, se plantea la pregunta de si esta propiedad de los receptores juega algún papel biológico. Puesto que los receptores aparecen en el desarrollo antes que la hormona, es posible que tengan algún papel independiente de la misma. La actividad del receptor en ausencia del ligando es importante en el desarrollo del oído interno (242), y en la metamorfosis (241). Durante el desarrollo fetal humano, la T3 que llega al cerebro antes del comienzo de la función tiroidea fetal depende de la T4 materna y de su conversión en T3 por acción de la D2. La actividad D2 aumenta en la corteza cerebral fetal a lo largo del segundo trimestre, y la concentración de T3 aumenta en paralelo (127). Durante el mismo período, el cerebelo expresa predominantemente D3, y las concentraciones de T3 se mantienen muy bajas. Es previsible, por lo tanto, que el receptor se encuentre ocupado por la hormona en la corteza, y desocupado en el cerebelo, atendiendo a los diferentes procesos biológicos que puedan estar teniendo lugar simultáneamente en distintas regiones encefálicas. En el período que hemos considerado del desarrollo del feto humano, tendrían lugar acciones radicalmente distintas del receptor de T3. Una en cerebelo, como factor de trans-

cripción con actividad represora, independiente de la hormona. Otra en corteza cerebral, en la que la T3 es capaz de modular la actividad de este receptor, dando lugar a nuevas propiedades transcripcionales.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Joffe, R.T., Sokolov S.T.H. (1994). Thyroid hormones, the brain, and affective disorders. *Crit. Rev. Neurobiol.* 8: 45-63.

(2) Laureno, R. (1996). Neurologic manifestations of thyroid disease. *The Endocrinologist* 6: 467-473.

(3) Ganguli, M., Burmeister, L.A., Seaberg, E.C. *et al.* (1996). Association between dementia and elevated TSH: a community-based study. *Biol. Psychiatr.* 40: 714-725.

(4) Anderson, G.W., Schoonover, C.M., Jones, S.A. (2003). Control of thyroid hormone action in the developing rat brain. *Thyroid* 13: 1039-1056.

(5) Bernal, J. (2005). Thyroid hormones and brain development. *Vitam Horm* 71: 95-122.

(6) Bernal, J. (2007). Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 249-259.

(7) Koibuchi, N., Iwasaki, T. (2006). Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. *Endocr J* 53: 295-303.

(8) Morreale de Escobar, G., Obregon, M.J., Escobar del Rey, F. (2004). Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur J. Endocrinol* 151 Suppl 3: U25-37.

(9) Fisher, D.A., Polk, D.H. (1988). Maturation of thyroid hormone actions. In *Research in congenital hypothyroidism*, ed. F. Delange, D.A. Fisher, D. Glinoer, pp. 61-77. New York: Plenum Press.

(10) Holt, A.B., Renfree, M.B., Chek, D.B. (1981). Comparative aspects of brain growth: a critical evaluation of mammalian species used in brain growth research with emphasis on the Tammar wallaby. In *Fetal brain disorders. Recent approaches to the problem of mental deficiency.*, ed. B.S. Hetzel, R.M. Smith, pp. 17-43. Amsterdam: Elsevier/North Holland.

(11) Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F., Ruiz-Marcos, A. (1983). Thyroid hormone and the developing brain. In *Congenital Hypothyroidism*, ed. J.H. Dussault, P. Walker, pp. 85-126. New York: Marcel Decker, Inc.

(12) Legrand, J. (1984). Effects of thyroid hormones on Central Nervous System. In *Neurobehavioral Teratology*, ed. J. Yanai, pp. 331-363. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

(13) Eayrs, J.T., Taylor, S.H. (1951). The effect of thyroid deficiency induced by methylthiouracil on the maturation of the central nervous system. *J. Anat*. 85: 350-358.

(14) Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M., Cadete-Leite, A. *et al*. (1988). Unbiased estimate of cerebellar granule cell numbers in hypothyroid and in sex-age-matched control rats. *J. Hirnforsch*. 29: 587-594.

(15) Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M., Cadete-Leite, A. *et al*. (1988). Unbiased estimate of hippocampal granule cell numbers in hypothyroid and in sex-age-matched control rats. *J. Hirnforsch*. 29: 643-650.

(16) Manzano, J., Cuadrado, M., Morte, B. *et al*. (2007). Influence of thyroid hormone and thyroid hormone receptors in the generation of cerebellar GABAergic interneurons from precursor cells. *Endocrinology*.

(17) Gilbert, M. E., Sui, L., Walker, M.J. *et al*. (2007). Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus. *Endocrinology* 148: 92-102.

(18) Gould, E., Butcher, L.L. (1989). Developing cholinergic basal forebrain neurons are sensitive to thyroid hormone. *J. Neurosci*. 9: 3347-3358.

(19) Gravel, C., Sasseville, R., Hawkes, R. (1990). Maturation of the corpus callosum of the rat: II. Influence of thyroid hormones on the number and maturation of axons. *J. Comp. Neurol*. 291: 147-161.

(20) Legrand, J. (1967). Analyse de l'action morphogénétic des hormones thyroïdiennes sur le cervelet du jeune rat. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp*. 56: 205-244.

(21) Ruiz-Marcos, A., Sanchez-Toscano, F., Obregón, M.J. *et al*. (1980). Reversible morphological alterations of cortical neurons in juvenile and adult hypothyroidism in the rat. *Brain Res*. 185: 91-102.

(22) Ruiz-Marcos, A., Sanchez-Toscano, F., Obregón, M.J. *et al*. (1982). Thyroxine treatment and recovery of hypothyroidism-induced pyramidal cell damage. *Brain Res*. 239: 559-574.

(23) Gould, E., Westlinddanielsson, A., Frankfurt, M. *et al*. (1990). Sex Differences and Thyroid Hormone Sensitivity of Hippocampal Pyramidal Cells. *J. Neurosci*. 10: 996-1003.

(24) Ruiz-Marcos, A., Cartagena, P., García, A. *et al*. (1988). Rapid effects of adult-onset hypothyroidism on dendritic spines of pyramidal cells of the rat cerebral cortex. *Exp. Brain Res*. 73: 583-588.

(25) Ambrogini, P., Cuppini, R., Ferri, P. *et al*. (2005). Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology*. 81: 244-253.

(26) Desouza, L.A., Ladiwala, U., Daniel, S.M. *et al*. (2005). Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 29: 414-426.

(27) Lemkine, G.F., Raj, A., Alfama, G. *et al*. (2005). Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *Faseb J* 19: 863-865.

(28) Montero-Pedrazuela, A., Venero, C., Lavado-Autric, R. *et al*. (2006). Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol Psychiatry* 11: 361-371.

(29) Hatten, M.E. (1990). Riding the glial monorail: a common mechanism for glial-guided neuronal migration in different regions of the developing mammalian brain. *Trends Neurosci*. 13: 179-184.

(30) Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol*. 145: 61-83.

(31) Gaiano, N., Nye, J.S., Fishell, G. (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*. 26: 395-404.

(32) Martinez-Galan, J.R., Pedraza, P., Santacana M. *et al*. (1997). Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. *J. Clin. Invest*. 99: 2701-2709.

(33) Berbel, P., Auso E., Garcia-Velasco, J.V. *et al*. (2001). Role of thyroid hormones in the maturation and organisation of rat barrel cortex. *Neuroscience* 107: 383-394.

(34) Berbel, P., Guadano-Ferraz, A., Martinez, M. *et al*. (1993). Organization of auditory callosal connections in hypothyroid adult rats. *Eur. J. Neurosci*. 5: 1465-1478.

(35) Berbel, P., Guadaño-Ferraz, A., Angulo, A. *et al*. (1994). Role of thyroid hormones in the maturation of interhemispheric connections in rat. *Behav. Brain Res*. 64: 9-14.

(36) Marin-Padilla, M. (1990). Three-dimensional structural organization of layer I of the human cerebral cortex: a Golgi study. *J. Comp. Neurol*. 299: 89-105.

(37) Alvarez-Dolado, M., Gonzalez-Moreno, M., Valencia, A. *et al*. (1999). Identification of a mammalian homologue of the fungal Tom70 mitochondrial precursor protein import receptor as a thyroid hormone-regulated gene in specific brain regions. *J. Neurochem*. 73: 2240-2249.

(38) García-Fernández, L.F., Rausell, E., Urade, Y. *et al*. (1997). Hypothyroidism alters the expression of prostaglandin D2 synthase/beta trace in specific areas of the developing rat brain. *Eur. J. Neurosci*. 9: 1566-1573.

(39) Del Rio, J.A., Heimrich, B., Borrell, V. *et al*. (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385: 70-74.

(40) Ausó, E., Lavado-Autric, R., Cuevas, E. *et al*. (2004). A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocorticogenesis alters neuronal migration. *Endocrinology* 145: 4037-4047.

(41) Goodman, J.H., Gilbert, M.E. (2007). Modest thyroid hormone insufficiency during development induces a cellular malformation in the corpus callosum: a model of cortical dysplasia. *Endocrinology* 148: 2593-2597.

(42) Nicholson, J.L., Altman, J. (1972). The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of the rat cerebellar cortex. I. Cell proliferation and differentiation. *Brain Res*. 44: 13-23.

(43) Balazs, R., Brooksbank, B.W.L., Davison, A.N. *et al*. (1969). The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. *Brain Res*. 15: 219-232.

(44) Malone, M.J., Rosman, N.P., Szoke, M. *et al*. (1975). Myelination of brain in experimental hypothyroidism. An electron-microscopic and biochemical study of purified myelin isolates. *J. Neurol. Sci*. 26: 1-11.

(45) Noguchi, T., Sugisaki, T. (1984). Hypomyelination in the cerebrum of the congenitally hypothyroid mouse (hyt). *J. Neurochem*. 42: 891-893.

(46) Adamo, A.M., Aloise, P.A., Soto, E.F. *et al*. (1990). Neonatal Hyperthyroidism in the Rat Produces an Increase in the Activity of Microperoxisomal Marker Enzymes Coincident with Biochemical Signs of Accelerated Myelination. *J. Neurosci. Res*. 25: 353-359.

(47) Notterpek, L.M., Rome, L.H. (1994). Functional evidence for the role of axolemma in CNS myelination. *Neuron* 13: 473-485.

(48) Escobar-Morreale, H., Obregón, M.J., Escobar del Rey F. *et al*. (1995). Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. *J. Clin. Invest*. 96: 2828-2838.

(49) Escobar-Morreale, H., Obregón, M.J., Escobar del Rey F. *et al*. (1999). Tissue-specific patterns of changes in 3,5,3'-triiodo-L-thyronine concentrations in thyroidectomized rats infused with increasing doses of the hormone. Which are the regulatory mechanisms? *Biochimie* 81: 453-462.

(50) Calvo, R., Obregón, M.J., Ruiz de Oña, C. *et al*. (1990). Congenital hypothyroidism, as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3'-triiodothyronine in the protection of the fetal brain. *J. Clin. Invest*. 86: 889-899.

(51) Galton, V.A., Wood, E.T., St Germain, E.A. *et al*. (2007). Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. *Endocrinology* 148: 3080-3088.

(52) Morreale de Escobar, G., Obregón, M.J., Escobar del Rey, F. (1987). Fetal and maternal thyroid hormones. *Horm. Res*. 26: 12-27.

(53) Morreale de Escobar, G., Pastor, R., Obregón, M.J. *et al*. (1985). Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues. *Endocrinology* 117: 1890-1901.

(54) Nataf, B., Sfez, M. (1961). Debut du fonctionnement de la thyroide foetale du rat. *Soc. Biol.* 156: 1235-1238.

(55) Obregón, M.J., Mallol, J., Pastor, R. *et al.* (1984). L-thyroxine and 3,3',5-triiodo-L-thyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 114: 305-307.

(56) Porterfield, S.P., Hendrich, C.E. (1992). Tissue iodothyronine levels in fetuses of control and hypothyroid rats at 13 and 16 days gestation. *Endocrinology* 131: 195-200.

(57) Woods, R.J., Sinha, A.K., Ekins, R.P. (1984). Uptake and metabolism of thyroid hormones by the rat foetus early in pregnancy. *Clin. Sci.* 67: 359-363.

(58) Morreale de Escobar, G., Calvo, R., Obregón, M.J. *et al.* (1990). Contribution of maternal thyroxine to fetal thyroxine pools in normal rats near term. *Endocrinology* 126: 2765-2767.

(59) Contempré, B., Jauniaux, E., Calvo, R. *et al.* (1993). Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 77: 1719-1722.

(60) Bernal, J., Pekonen, F. (1984). Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the human fetal brain. *Endocrinology* 114: 677-679.

(61) Vulsma, T., Gons M.H., de Vijlder, J. (1989). Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid dysgenesis. *N. Eng. J. Med.* 321: 13-16.

(62) Bianco, A.C., Larsen, P. R. (2005). Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid* 15: 777-786.

(63) Larsen, P.R., Silva, J.R., Kaplan, M.M. (1981). Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones. Physiological and clinical implications. *Endocr. Rev.* 2: 87-102.

(64) Van Doorn, J., Roelfsema, F., van der Heide, D. (1982). Contribution from local conversion of thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine to intracellular 3,5,3'-triiodothyronine in several organs in hypothyroid rats at isotope equilibrium. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 101: 386-396.

(65) Crantz, F.R., Silva, J.E., Larsen, P.R. (1982). An analysis of the sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cerebral cortex and cerebellum. *Endocrinology.* 110: 367-375.

(66) Bates, J.M., St. Germain, D.L., Galton, V.A. (1999). Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases D1, D2 and D3, in the developing rat. *Endocrinology* 140: 844-851.

(67) Ruiz de Oña, C., Obregón, M.J., Escobar del Rey, F. *et al.* (1988). Developmental changes in rat brain 5'-deiodinase and thyroid hormones during the fetal period: the effects of fetal hypothyroidism and maternal thyroid hormones. *Pediatr. Res.* 24: 588-594.

(68) Leonard, J.L., Kaplan, M.M., Visser, T.J. *et al*. (1981). Cerebral cortex responds rapidly to thyroid hormones. *Science* 214: 571-573.

(69) Obregón, M.J., Ruiz de Oña, C., Calvo, R. *et al*. (1991). Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology* 129: 2663-2673.

(70) Farwell, A.P., Leonard, J.L. (1992). Dissociation of actin polymerization and enzyme inactivation in the hormonal regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase activity in astrocytes. *Endocrinology* 131: 721-728.

(71) Farwell, A.P., DiBenedetto, D.J., Leonard, J.L. (1993). Thyroxine targets different pathways of internalization of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. *J. Biol. Chem*. 268: 5055-5062.

(72) Stachelek, S.J., Kowalik, T.F., Farwell, A.P. *et al*. (2000). Myosin V plays an essential role in the thyroid hormone-dependent endocytosis of type II iodothyronine 5'-deiodinase. *J Biol Chem* 275: 31701-31707.

(73) Steinsapir, J., Bianco, A.C., Buettner C. *et al*. (2000). Substrate-induced down-regulation of human type 2 deiodinase (hD2) is mediated through proteasomal degradation and requires interaction with the enzyme's active center. *Endocrinology* 141: 1127-1135.

(74) Steinsapir, J., Harney, J., Larsen, P.R. (1998). Type 2 iodothyronine deiodinase in rat pituitary tumor cells is inactivated in proteasomes. *J. Clin. Invest*. 102: 1895-1899.

(75) Burmeister, L.A., Pachucki, J., St. Germain, D.L. (1997). Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology*. 138: 5231-5237.

(76) Croteau, W., Davey, J.C., Galton, V.A. *et al*. (1996). Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase: a selenoprotein differentially expressed and regulated in the human brain and other tissues. *J. Clin. Invest*. 98: 405-417.

(77) Guadaño-Ferraz, A., Escámez, M.J., Rausell, E. *et al*. (1999). Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J. Neurosci*. 19: 3430-3439.

(78) Tu, H.M., Kim, S.W., Salvatore, D. *et al*. (1997). Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138: 3359-3368.

(79) Riskind, P.N., Kolodny, J.M., Larsen, P.R. (1987). The regional distribution of type II 5'-monodeiodinase in euthyroid and hypothyroid rats. *Brain Res*. 420: 194-198.

(80) Guadaño-Ferraz, A., Obregón, M.J., St-Germain, D. *et al*. (1997). The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10391-10396.

(81) Rodriguez, E.M., Gonzalez, C.B., Delannoy, L. (1979). Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res*. 201: 377-408.

(82) Lechan, R.M., Fekete, C. (2007). Infundibular tanycytes as modulators of neuroendocrine function: hypothetical role in the regulation of the thyroid and gonadal axis. *Acta Biomed* 78 Suppl. 1: 84-98.

(83) Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A. *et al*. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28: 264-278.

(84) Bradley, D.J., Towle, H.C., Young, W.S. (1992). Spatial and temporal expression of α- and β- thyroid hormone receptor mRNAs, including the β_2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci*. 12: 2288-2302.

(85) Mellström, B., Naranjo, J.R., Santos, A. *et al*. (1991). Independent expression of the α and β c-erbA genes in developing rat brain. *Mol. Endocrinol*. 5: 1339-1350.

(86) Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci*. 16: 877-885.

(87) Campos-Barros, A., Amma, L.L., Faris, J.S. *et al*. (2000). Type 2 iodothyronine deiodinase expression in the cochlea before the onset of hearing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1287-1292.

(88) Bradley, D.J., Towle, H.C., Young, W.S.I. (1994). Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 439-443.

(89) Lauterman, J., ten Cate, W.J.F. (1997). Postnatal expression of the rat alpha-thyroid hormone receptor in the rat cochlea. *Hearing Res*. 107: 23-28.

(90) Galton, V.A., Schneider, M.J., Clark, A.S. *et al*. (2009). Life without T4 to T3 conversion: Studies in mice devoid of the 5'-deiodinases. *Endocrinology*.

(91) St. Germain, D.L. (1995). Thyroid hormone deiodination. *Curr. Op. Endocrinol. Diabetes* 2: 421-428.

(92) Kaplan, M.M., Yaskoski, K.A. (1981). Maturational patterns of iodothyronine phenolic and tyrosyl ring deiodinase activities in rat cerebrum, cerebellum, and hypothalamus. *J. Clin. Invest*. 67: 1208-1214.

(93) Santini, F., Chiovato, L., Ghirri, P. *et al*. (1999). Serum iodothyronines in the human fetus and the newborn: evidence for an important role of placenta in fetal thyroid hormone homeostasis. *J. Clin. Endocrinol. Metabol*. 84: 493-498.

(94) Schröder-van der Elst, J.P., Van der Heide, D., Morreale de Escobar, G. *et al*. (1998). Iodothyronine deiodinase activities in fetal rat tissues at several levels of iodine deficiency: a role for the skin in 3,5,3'-triiodothyronine economy? *Endocrinology* 139: 2229-2234.

(95) Kaplan, M.M., Shaw, E.A. (1984). Type II iodothyronine 5'-deiodination by human and rat placenta in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metabol*. 59: 253-257.

(96) Koopdonk-Kool, J.M., De Vijlder, J.J., Veenboer, G.J.M. *et al*. (1996). Type II and type III deiodinase activity in human placenta as a function of gestational age. *J. Clin. Endocrinol. Metabol*. 81: 2154-2158.

(97) Escámez, M.J., Guadaño-Ferraz, A., Cuadrado, A. *et al*. (1999). Type 3 iodothyronine deiodinase is selectively expressed in areas related to sexual differentiation in the newborn rat brain. *Endocrinology* 140: 5443-5446.

(98) Tu, H.M., Legradi, G., Bartha, T. *et al*. (1999). Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 140: 784-790.

(99) Courtin, F., Liva, P., Gavaret, J.M. *et al*. (1991). Induction of 5-deiodinase activity in astroglial cells by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and fibroblast growth factors. *J. Neurochem*. 56: 1107-1113.

(100) Esfandiari, A., Courtin, F., Lennon, A.M. *et al*. (1992). Induction of type III deiodinase activity in astroglial cells by thyroid hormones. *Endocrinology* 131: 1682-1688.

(101) Esfandiari, A., Gagelin, C., Gavaret, J.M. *et al*. (1994). Induction of type III-deiodinase activity in astroglial cells by retinoids. *Glia* 11: 255-261.

(102) Becker, K.B., Stephens, K.C., Davey, J.C. *et al*. (1997). The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinases play important roles in coordinating development in Rana catesbeiana tadpoles. *Endocrinology* 138: 2989-2997.

(103) Berry, D.L., Rose, C.S., Remo, B.F. *et al*. (1998). The expression pattern of thyroid hormone response genes in remodeling tadpole tissues defines distinct growth and resorption gene expression programs. *Dev. Biol*. 203: 24-35.

(104) Huang, H., Marsh-Armstrong, N., Brown, D.D. (1998). Metamorphosis is inhibited in transgenic xenopus laevis tadpoles that overexpress type III deiodinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 962-967.

(105) Marsh-Armstrong, N., Huang, H., Remo, B.F. *et al*. (1999). Asymmetric growth and development of the xenopus laevis retina during metamorphosis is controlled by type III deiodinase. *Neuron* 24: 871-878.

(106) Mortimer, R.H., Galligan, J.P., Cannell, G.R. *et al*. (1996). Maternal to fetal thyroxine transmission in the human term placenta is limited by inner ring deiodination. *J. Clin. Endocrinol. Metabol*. 81: 2247-2249.

(107) Galton, V.A., Martínez, E., Hernández, A. *et al*. (1999). Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. *J. Clin. Invest*. 103: 979-987.

(108) Baum, M.J. (1999). Psychosexual development. In *Fundamental Neuroscience*, ed. M.J. Zigmond, F.E. Bloom, S.C. Landis, *et al*, pp. 1229-1244. San Diego: Academic Press.

(109) Dellovade, T.L., Zhu, Y.S., Krey, L. *et al*. (1996). Thyroid hormone and estrogen interact to regulate behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12581-12586.

(110) Hernández, A., Mart´ínez, M.E., Fiering, S. *et al*. (2006). Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest* 116: 476-484.

(111) Hernández, A., Martínez, M.E., Liao X.H. *et al*. (2007). Type 3 deiodinase deficiency results in functional abnormalities at multiple levels of the thyroid axis. *Endocrinology* 148: 5680-5687.

(112) Dumitrescu, A.M., Liao, X.H., Best, T.B. *et al*. (2004). A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* 74: 168-175.

(113) Friesema, E.C., Grueters, A., Biebermann, H. *et al*. (2004). Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 364: 1435-1437.

(114) Friesema, E.C., Jansen, J., Milici, C. *et al*. (2005). Thyroid hormone transporters. *Vitam Horm* 70: 137-167.

(115) Roberts, L.M., Woodford, K., Zhou, M. *et al*. (2008). Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* 149: 6251-6261.

(116) Ceballos, A., Belinchon, M.M., Sanchez-Mendoza, E. *et al*. (2009). Importance of Monocarboxylate transporter 8 (Mct8) for the blood-brain barrier dependent availability of 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine (T3). *Endocrinology* In Press.

(117) Heuer, H., Maier, M.K., Iden, S. *et al*. (2005). The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology* 146: 1701-1706.

(118) Pérez-Castillo, A., Bernal, J., Ferreiro, B. *et al*. (1985). The early ontogenesis of thyroid hormone receptor in the rat fetus. *Endocrinology* 117: 2457-2461.

(119) Schwartz, H.L., Oppenheimer, J.H. (1978). Ontogenesis of 3,5,3'-triiodothyronine receptors in neonatal rat brain, dissociation between receptor concentration and stimulation of oxygen consumption by 3,5,3'-triiodothyronine. *Endocrinology* 103: 943-948.

(120) Strait, K.A., Schwartz, H.L., Perezcastillo, A. *et al*. (1990). Relationship of C-erbA Messenger RNA Content to Tissue Triiodothyronine Nuclear Binding Capacity and Function in Developing and Adult Rats. *J. Biol.Chem*. 265: 10514-10521.

(121) Ferreiro, B., Pastor, R., Bernal, J. (1990). T3 receptor occupancy and T3 levels in plasma and cytosol during rat brain development. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 123: 95-99.

(122) Bradley, D.J., Young, III W.S., Weinberger, C. (1989). Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 72507254.

(123) Ercan-Fang, S., Schwartz, H.L., Oppenheimer, J.H. (1996). Isoform specific 3,5,3'-triiodothyronine receptor binding capacity and messenger ribonucleic acid content in rat adenohypophysis: Effect of thyroidal state and comparison with extrapituitary tissues. *Endocrinology* 137: 3228-3233.

(124) Iskaros, J., Pickard, M., Evans, I. *et al*. (2000). Thyroid hormone receptor gene expression in first trimester human fetal brain. *J. Clin. Endocrinol. Metabol*. 85: 2620-2623.

(125) Dobbing, J., Sands, J. (1970). Timing of neuroblast multiplication in developing human brain. *Nature* 226: 639-640.

(126) Ferreiro, B., Bernal, J., Goodyer, C.G. *et al*. (1988). Estimation of nuclear thyroid hormone receptor saturation in human fetal brain and lung during early gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metabol*. 67: 853-856.

(127) Kester, M.H., Martinez de Mena, R., Obregon, M.J. *et al*. (2004). Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3117-3128.

(128) Dong, H., Wade, M., Williams, A. *et al*. (2005). Molecular insight into the effects of hypothyroidism on the developing cerebellum. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 1182-1193.

(129) Martel, J., Cayrou, C., Puymirat, J. (2002). Identification of new thyroid hormone-regulated genes in rat brain neuronal cultures. *Neuroreport* 13: 1849-1851.

(130) Miller, L.D., McPhie, P., Suzuki, H. *et al*. (2004). Multi-tissue gene-expression analysis in a mouse model of thyroid hormone resistance. *Genome Biol* 5: R31.

(131) Poguet, A.L., Legrand, C., Feng, X. *et al*. (2003). Microarray analysis of knockout mice identifies cyclin D2 as a possible mediator for the action of thyroid hormone during the postnatal development of the cerebellum. *Dev Biol* 254: 188-199.

(132) Quignodon, L., Grijota-Martinez, C., Compe, E. *et al*. (2007). A combined approach identifies a limited number of new thyroid hormone target genes in postnatal mouse cerebellum. *J Mol Endocrinol* 39: 17-28.

6. Acciones de la insulina sobre el Sistema Nervioso Central (SNC)

FERNANDO ESCRIVÁ PONS

Profesor Titular, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense (Madrid).

RESUMEN

Este capítulo constituye una revisión sobre los efectos de la insulina en el Sistema Nervioso Central (SNC), considerada especialmente desde un punto de vista fisiopatológico. La insulina está presente en distintas regiones del SNC y se admite que su procedencia es pancreática. La hormona alcanza las estructuras cerebrales en un proceso de saturación, indicativo de la existencia de un transportador que podría ser el propio receptor o alguna otra molécula relacionada. Asimismo, los componentes de la vía de señales de la insulina también se encuentran en muchas regiones cerebrales. Describimos las funciones que ejerce la insulina en el SNC en cuanto a la homeostasis energética y glucídica. Además, muchos estudios han demostrado que la insulina influye sobre ciertas funciones cognitivas, tanto en animales como en el ser humano; aquí se revisan los principales puntos establecidos al respecto. Por otra parte, se ha sugerido que en la etiología o sintomatología de algunas enfermedades podría estar implicada una alteración de las acciones centrales de la insulina; en base a ello, en esta revisión se describe esa posibilidad, utilizando como ejemplo dos importantes patologías: la enfermedad de Alzheimer y la diabetes mellitus.

ABSTRACT

The present chapter reviews the current knowledge on the effects of insulin in the Central Nervous System (CNS), from physiological and pathological perspectives. Insulin is found in different regions of CNS; at present, it is well established

that pancreas constitutes the main source of insulin in the CNS structures. Plasma insulin reaches the brain via a saturable mechanism in which hormone receptor, or some protein closely related to receptor, seems to be implicated as carrier. Besides receptor, insulin signalling components are widely distributed in brain. Among the different insulin functions on CNS we describe its roles on both energetic and glucidic homeostasis. Numerous studies involving animals and humans have demonstrated that insulin participates in the modulation of actions related to certain brain cognitive functions; thus, we review what is established at present on the hormone implication in such phenomena. On the other hand, research in this field has also suggested that alterations of central insulin actions may be implicated in the ethiology and/or symptons of some pathologies, so we develop this subject, specially with regard to Alzheimer's disease and diabetes mellitus.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de que la insulina ejerciera acciones directas sobre el SNC comenzó a considerarse hace 25 años; aunque ha sido un concepto muy controvertido, ya no hay dudas al respecto: esta hormona produce efectos directos y variados sobre las células nerviosas. Sin embargo, los mecanismos subyacentes aún no son bien conocidos. Uno de los principales obstáculos para su estudio deriva del hecho de que la insulina lleva a cabo acciones intensas sobre el metabolismo en los tejidos periféricos, especialmente sobre la homeostasis de la glucosa, acciones que acaban por inducir una marcada hipoglucemia; a su vez, los cambios en la concentración de la glucosa en sangre tienen repercusiones sobre el SNC, las cuales pueden confundirse con efectos directos de la hormona. En realidad la influencia es recíproca porque, a su vez, algunas de las acciones centrales de la insulina tienen consecuencias sobre los tejidos periféricos. En definitiva, en muchos casos es difícil distinguir si un cambio observado en el SNC después de la administración de insulina constituye un efecto directo y específico de esta hormona sobre las células nerviosas o más bien deriva de sus acciones periféricas. Sin embargo, múltiples evidencias experimentales en las que se ha superado este problema permiten hoy afirmar inequívocamente que la insulina actúa sobre el cerebro; algunos de sus efectos están demostrados sin lugar a dudas, como los que se refieren al control de la homeostasis energética; otros todavía son relativamente poco conocidos, como los que indican que la insulina ejerce algún tipo de regulación sobre las funciones cognitivas. Por otra parte, hay muchos datos clínicos y experimentales que favorecen la idea de que esta hormona, debido a sus efec-

tos directos sobre las células nerviosas, podría estar implicada en algunas enfermedades neurodegenerativas en las cuales sus acciones sobre el SNC se encontrarían alteradas (1).

El hecho de que la insulina sea capaz de actuar directamente sobre las células nerviosas no resulta un concepto insólito cuando se considera desde un punto de vista evolutivo. En los invertebrados -insectos, gusanos, moluscos, etc.- existen diversas moléculas peptídicas similares a esa hormona cuya función, generalmente, consiste en modular procesos de crecimiento y desarrollo; también se encuentran en ellos los receptores y las vías de señales de esos péptidos, los cuales resultan ser homólogos a sus contrapartidas presentes en los animales superiores. Todos esos compuestos, como la propia insulina, forman parte de una superfamilia de factores estrechamente relacionados; es probable que se originaran a partir de un gen ancestral que experimentó procesos de divergencia y modificación en el curso del tiempo. Pues bien: en los invertebrados, algunos de esos compuestos están presentes en el SNC, son sintetizados por diversas células neurosecretoras, y ejercen efectos de neurotransmisión o neuromodulación. No es extraño, en consecuencia, que en los animales superiores la propia insulina también se encuentre en las células nerviosas y tenga la capacidad de influir directamente sobre ellas.

ENTRADA DE LA INSULINA AL SNC

A finales del siglo XIX, Paul Ehrlich observó que cuando el colorante anilina se inyectaba en la sangre de ratones era capaz de teñir todos sus tejidos excepto el cerebro; fue la primera indicación de la existencia de una barrera capaz de impedir el paso de sustancias desde la sangre a los tejidos cerebrales, que se denominó barrera hemato-encefálica (bhe). Esta protege al órgano más delicado del cuerpo, el cerebro, evitando que lleguen hasta él compuestos potencialmente tóxicos. Muchas de las características estructurales y funcionales de esta barrera ya son bien conocidas. No se trata de una estructura inerte sino dinámica y su actuación es selectiva; por ello ejerce un papel modulador: permite la entrada y salida reguladas de numerosas moléculas, para que su concentración cerebral sea la adecuada. Como principio general, se admite que las sustancias lipofóbicas y de gran tamaño no atraviesan directamente la barrera, mientras que las moléculas pequeñas y liposolubles lo hacen por difusión directa. Además de esta difusión, se ha demostrado la existencia de otros dos mecanismos de transporte a través de la barrera: por endocitosis o mediante proteínas transportadoras.

La cuestión concreta sobre si la insulina, un pequeño péptido hidrosoluble, es capaz de atravesar la bhe y entrar en el cerebro está planteada desde mediados de los años 50 del siglo XX y se ha ido respondiendo a ella de manera controvertida. En una primera etapa, algunos trabajos experimentales dedicados a este problema ofrecieron resultados negativos y llevaron a la conclusión de que la insulina no alcanzaba las estructuras cerebrales. Sin embargo, años después, el desarrollo de la la técnica del RIA para analizar hormonas permitió demostrar de manera inequívoca la existencia de insulina en el líquido cefalorraquídeo, lo que condujo a la sospecha de que la hormona presente en las estructuras del SNC procedía de la sangre (2). Pero varios resultados contradecían esa suposición; por ejemplo, en algunos trabajos se encontró que el cerebro contenía el mRNA correspondiente a la proinsulina, lo que llevó a proponer que la hormona presente en el SNC sería sintetizada directamente por las células nerviosas (3). En cambio, en otros estudios no se detectó dicho mRNA (4), concluyéndose en consecuencia que si la insulina se expresaba realmente en las células nerviosas debía de hacerlo con una intensidad muy baja. Más tarde, diferentes autores han ido confirmando que la síntesis de insulina por parte de las células nerviosas debe ser nula o, en todo caso, insignificante (5). En conclusión, lo que hoy se acepta es que casi la totalidad de la insulina presente en las diferentes estructuras cerebrales (probablemente toda la hormona) tiene un origen periférico: es decir, se ha generado en el páncreas y procede de la sangre. Se ha visto que la concentración de insulina en el SNC se correlaciona con sus niveles plasmáticos en diferentes circunstancias, un hecho sugerente de que la hormona haya atravesado la bhe. El transvase de la insulina hacia el cerebro no es un fenómeno excepcional: también ocurre para múltiples péptidos, polipéptidos y proteínas. En todos los casos existen sistemas de transporte en la bhe que permiten que estas moléculas alcancen las estructuras cerebrales (6).

Experimentos basados en la inyección de diferentes tipos de insulina, con características inmunológicas distintas a la de la hormona propia del animal tratado, así como en la administración de insulina marcada radiactivamente, han demostrado que la captación de ésta por el SNC ocurre mediante un proceso específico y saturable; ello demuestra la existencia de alguna proteína transportadora que estaría situada en la bhe. La intensidad de la captación difiere de unas a otras regiones del SNC; en algunas, como el hipotálamo y el bulbo olfatorio, la entrada de insulina es elevada, mientras que en otras, como el córtex occipital, la tasa de transporte es muy baja. Se ha sugerido que estas diferencias podrían estar relacionadas con las distintas funciones que la hormona ejerce en las diversas regiones que componen el SNC (7).

Una característica general de los procesos de captación mediatizados por proteínas transportadoras es que su intensidad puede modificarse en diferentes situaciones fisiopatológicas. Pues bien: así ocurre en el caso de la insulina, cuyo transporte al cerebro está incrementado durante la etapa neonatal y en modelos experimentales de diabetes inducida químicamente; en cambio, su captación disminuye en otras situaciones, como el ayuno, obesidad, tratamiento con dexametasona y enfermedad de Alzheimer (6). Estos hechos sugieren la existencia de factores capaces de influir sobre la tasa de transporte de la insulina a través de la bhe.

En definitiva, múltiples hechos experimentales favorecen la posibilidad de que exista una proteína para el transporte de la insulina a través de la bhe, pero la realidad es que ésta todavía no ha sido identificada. Algunos autores han sugerido que la molécula que asuma esa función sea el propio receptor hormonal -ya que existen sitios de ligadura a la insulina que están situados en las células endoteliales de los capilares- y que el transporte se base en un proceso de endocitosis (transcitosis); otra posibilidad planteada es que el transportador sea una proteína relacionada con el receptor, a semejanza de lo que ocurre para la captación de TNF-α y leptina; pero ninguna de esas hipótesis ha sido demostrada (7). Lo cierto es que la identificación de la molécula responsable del paso de la insulina a través de la bhe, así como el mecanismo concreto implicado en el proceso, constituyen problemas todavía no resueltos.

Un aspecto interesante de la insulina en relación con la bhe es que esta misma estructura podría ser objeto de algunos de sus efectos. Como se ha dicho, las células endoteliales de los capilares de la barrera poseen sitios de ligadura a la hormona; podría tratarse de sus transportadores, pero también podrían ser los propios receptores, actuando como tales (quizá constituyan una misma entidad molecular, como se ha señalado anteriormente) (8). Ello abre la posibilidad de que la insulina sea capaz de regular las funciones de la bhe. Así, se sospecha que esta hormona modula el transporte de algunos aminoácidos al cerebro, como tirosina y triptófano, y por lo tanto podría influir sobre la concentración cerebral de los neurotransmisores derivados de ellos (catecolaminas y serotonina) (9). También se sabe que la insulina incrementa la captación cerebral de leptina (10). En cambio, no parece tener efectos sobre la entrada de GH al SNC, proceso que tiene lugar mediante difusión simple (11).

En el cerebro existen seis o siete pequeñas regiones que carecen de bhe; están situadas alrededor de las paredes del tercer y cuarto ventrículos, y por eso se denominan *órganos circumventriculares*; constituyen importantes zonas de comunicación entre el líquido cefalorraquídeo y el cerebro. En esas regiones, el

endotelio capilar presenta fenestraciones, a través de las cuales se produce el paso directo de ciertas macromoléculas desde la sangre hacia las células nerviosas próximas (neuronas, astrocitos). Se ha sugerido la posibilidad de que una parte de la insulina que accede al SNC lo haga a través de esa vía; sin embargo, no hay evidencias que lo demuestren (12).

VÍA DE SEÑALES DE LA INSULINA EN EL SNC

El receptor de insulina está presente en todas las regiones del SNC, tanto en las neuronas (en la membrana de las terminaciones sinápticas y postsinápticas) como en glías, mucho más concentrado en las primeras (13). Su distribución regional no es uniforme: abunda más en algunas zonas concretas, como córtex, cerebelo, hipocampo, hipotálamo, amígdala y bulbo olfatorio (revisado en 14). Como es sabido, existen dos isoformas del receptor de insulina, designadas como A y B. Se diferencian en doce aminoácidos codificados por el exon 11, los cuales están presentes en la isoforma B pero no en la A que, en consecuencia, es un poco más pequeña. El origen de esa diferencia es post-translacional, deriva de un proceso de "splicing" alternativo del mRNA en el exón indicado. Se considera que el tipo A es propiamente una variedad fetal. En el SNC están presentes las dos isoformas del receptor. Tanto una como otra tienen un peso molecular inferior al de los receptores de tejidos periféricos, debido a que el grado de glucosilación de sus subunidades α y β es menor (15). Las dos isoformas tienen distintas afinidades por la insulina y los IGFs; la B posee elevada afinidad por la hormona y solamente es capaz de unirse al IGF-2 cuando éste se encuentra a concentraciones suprafisiológicas; en cambio, el receptor de tipo A se une a la insulina y al IGF-2 con afinidades similares, pero no al IGF-1 a concentraciones fisiológicas de éste. Es interesante señalar que a pesar de las funciones importantes que lleva a cabo el receptor de insulina en el SNC, su ablación genética específica no compromete la supervivencia, aunque conlleva importantes alteraciones; en cambio, la deleción generalizada del receptor en todos los tejidos es una condición letal (16).

Los mecanismos moleculares por los cuales la insulina desarrolla sus acciones en el SNC son los mismos que operan en los tejidos periféricos: cuando la hormona se une a sus receptores centrales éstos se fosforilan e inducen la transmisón del estímulo a través de sus vías conocidas. Como es bien sabido, se trata de dos cadenas de señales moleculares que se activan en paralelo; una de ellas conduce a la estimulación de PI3k (fosfatidilinositol 3-kinasa) y Akt (una serina-treonina kinasa denominada también PKB, proteín-kinasa B); la otra,

a través de Shc y ras, produce la activación de las MAPK (proteín-kinasas activadas por mitógenos). Ambas cadenas se influyen recíprocamente, un fenómeno denominado *cross-talk*. En la bibliografía se encuentran excelentes revisiones en las que se describen las moléculas que integran las dos vías, de modo que no se detallarán aquí (por ejemplo, véase la referencia 17).

FUNCIONES DE LA INSULINA EN EL SNC

Una de las respuestas a la insulina más típicas en dos importantes tejidos periféricos, adiposo y muscular, es el incremento de la captación de glucosa. Ambos tejidos contienen una isoforma específica de las que comprende la familia de transportadores pasivos de esta hexosa (proteínas denominadas GLUTs), isoforma que se caracteriza por ser sensible a la hormona: GLUT-4. Concretamente, la insulina induce un cambio de su ubicación celular: la translocación desde compartimentos citoplasmáticos hasta la membrana superficial, lo que conlleva un aumento de la captación de glucosa. En los primeros estudios sobre los efectos de la insulina en el SNC se vio que esta hormona no incrementaba dicha captación; de ahí se dedujo que el cerebro era un órgano insensible a ella, una idea que fue ampliamente aceptada durante muchos años. Sin embargo, más tarde se demostró que la insulina era capaz de promover la captación de glucosa en células nerviosas en cultivo (18) y también que el GLUT-4 estaba presente en algunas regiones del SNC, en donde coincidía con el receptor de insulina; además, se vio que la hormona incrementaba la entrada de glucosa en el hipocampo y en el hipotálamo (19). A pesar de este tipo de resultados, la idea de que ciertas células o áreas del SNC sean sensibles a la insulina en cuanto a la captación de glucosa todavía no es aceptada ampliamente, porque no se ha confirmado de manera inequívoca (1). Hay que tener en cuenta que aunque el GLUT-4 sea una isoforma de transportador presente en el cerebro, se encuentra en escasa proporción; en realidad, en el tejido nervioso las isoformas más abundantes son el GLUT-1 y GLUT-3. El primero se encuentra en las células endoteliales de los capilares así como en los astrocitos, mientras que el GLUT-3 es la isoforma predominante en las neuronas (20); sin embargo, ninguna de éstas experimenta translocación por la acción de la insulina. Esta hormona también influye, en los tejidos periféricos, sobre la actividad de algunas enzimas que intervienen en el metabolismo glucídico, lipídico y proteico, así como en el ciclo tricarboxílico; sin embargo, no se han llevado a cabo estudios sistemáticos para comprobar si ese tipo de efectos de la insulina también se producen —y tienen una importancia significativa— en las distintas regiones del

sistema nervioso. Están mejor estudiadas, o comienzan a investigarse, otras acciones que ejerce la insulina sobre el SNC, que se describen a continuación.

1. Control central de la homeostasis energética

Como es bien sabido, la parte del SNC que juega el papel más importante en la regulación de la homeostasis energética (ingesta y gasto calórico) es el hipotálamo. Situado en la zona inferior y delantera del encéfalo, el hipotálamo es una estructura pequeña, pero heterogénea: está integrado por múltiples núcleos funcionalmente diferentes, lo que permite su intervención en el control de muchos procesos fisiológicos. En estudios ya clásicos, basados en estimulaciones eléctricas, se llegó a la conclusión de que el hipotálamo contenía dos regiones fundamentales que se designaron como "centros de la saciedad y del hambre", debido a que su activación provocaba hipofagia e hiperfagia, respectivamente. Hoy se sabe que la realidad es mucho más compleja porque estos efectos son ejercidos por "circuitos funcionales", más que por "centros". En diferentes capítulos de una publicación monográfica de la Real Academia de Farmacia se describe ampliamente el modo de participación del hipotálamo en el control de la homeostasis energética (21); aquí se expone un breve resumen de esa cuestión, como contexto básico para entender los efectos de la insulina sobre esa estructura del SNC.

La región hipotalámica más importante en el control de la ingesta y el gasto energético es el núcleo arcuado porque constituye el punto primario de integración de las señales relacionadas con el hambre y la saciedad procedentes de la periferia. Estas señales son nutrientes y factores hormonales, cuya concentración en la sangre es dependiente del estado nutricional. El núcleo arcuado contiene dos subpoblaciones celulares: 1) unas neuronas que estimulan efectos de tipo anabólico, porque producen sustancias con acción orexigénica: el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con Agouti (AgRP); suelen denominarse neuronas NPY/AgRP. 2) las otras neuronas estimulan el catabolismo, porque producen péptidos anorexigénicos: la hormona estimulante de los melanocitos (α-MSH) -procedente de la pro-opiomelanocortina (POMC)- y el transcrito relacionado con cocaína y anfetamina (CART); se les denomina neuronas POMC/CART. Las neuronas del núcleo arcuado proyectan fibras que finalizan sobre otras neuronas, situadas en diferentes núcleos hipotalámicos: paraventricular, ventromedial, etc. Estas fibras permiten la llegada de todos esos péptidos a dichos núcleos, un proceso necesario para que induzcan sus efectos orexigénicos y anorexigénicos. Además, entre las dos subpoblaciones del núcleo ar-

cuado existen fibras que las conectan; son conexiones que discurren en una y otra dirección, gracias a lo cual la estimulación de las neuronas anabólicas provoca la inhibición de las catabólicas y viceversa (22).

Las dos subpoblaciones neuronales del núcleo arcuado contienen receptores de insulina y leptina; por lo tanto, son sensibles a ambas hormonas. Los efectos de esta última están mejor caracterizados que los de la insulina, pero en ambos casos tienen las mismas consecuencias: aumentar la actividad de las neuronas catabólicas (anorexigénicas) e inhibir la actividad de las neuronas anabólicas (orexigénicas). En consecuencia, cuando los niveles de insulina son bajos (como ocurre en el ayuno) y disminuye el nivel de ocupación de sus receptores en el núcleo arcuado, se incrementa la producción de péptidos orexigénicos (NPY, AgRP), mientras que se inhibe la síntesis de los anorexigénicos (α-MSH, CART); como consecuencia se suscita la sensación de hambre. Por el contrario, frente a niveles altos de insulina (estado postprandial), la tasa de producción de ambos tipos de péptidos cambia en sentido opuesto al descrito, de modo que aparece la sensación de saciedad. Es interesante destacar que la insulina, que se comporta como hormona fuertemente anabólica en los tejidos periféricos, actúa como un factor catabólico sobre el SNC (23).

La descripción anterior supone una simplificación de los mecanismos que operan en la homeostasis energética; en realidad son mucho más complejos y en ellos intervienen simultáneamente las dos hormonas, insulina y leptina, junto con otros compuestos. La insulina es capaz de potenciar la vía de señales inducida típicamente por la leptina, vía que comprende a los intermediarios JAK-2 y STAT-3 (24); por ello, cuando ambas hormonas actúan al mismo tiempo se influyen mutuamente. Se piensa que los efectos ejercidos por la insulina sobre el control de la ingesta son inmediatos, mientras que los de la leptina ocurren en un plazo más largo, porque implican modificaciones de la intensidad de la transcripción génica (25).

2. Control central de la homeostasis glucídica

Como se ha señalado anteriormente, una de las funciones del SNC consiste en integrar las señales relacionadas con la situación energética del organismo, para responder adecuadamente a las necesidades que esa situación susciten. Esa respuesta está determinada por los niveles de sustratos y hormonas en la sangre, así como por la magnitud de las reservas calóricas en los tejidos periféricos. La insulina y la leptina son dos hormonas cruciales al respecto, como se ha señalado en el apartado anterior. En ese apartado se ha descrito el papel desempeñado por la insulina en la regulación central de la ingesta y saciedad; pero hay que remarcar

que, además de esa función, la insulina ejerce otras acciones en el SNC cuya característica principal es que repercuten sobre los mecanismos de control de la homeostasis glucídica que son operativos en los tejidos periféricos. Así, la inhibición experimental de la acción insulínica en el hipotálamo o, por el contrario, el estímulo directo del núcleo arcuado con esta hormona son situaciones que inducen cambios en la sensibilidad de los tejidos periféricos a ella misma (26). Uno de los efectos bien conocidos que se producen al inhibir la acción insulínica sobre el hipotálamo consiste en la disminucion de la capacidad de esta hormona para frenar la producción hepática de glucosa (27). De modo que para frenar esa producción, la insulina actúa por dos vías: a) directa, por medio de la ocupación de sus receptores en el hígado; b) indirecta, al unirse a sus receptores hipotalámicos (28, 29).

Los mecanismos implicados en esta acción central con repercusión periférica constituyen un tema de investigación muy importante desde el punto de vista clínico. Hay que tener en cuenta que, debido a estos efectos indirectos, una disminución en la sensibilidad hipotalámica a la insulina podría ocasionar que la eficacia de esta hormona para frenar la producción hepática de glucosa se redujese, lo cual contribuiría al cuadro de hiperglucemia de un paciente diabético (27). La base molecular de estos mecanismos consiste en el estímulo de la insulina, mediatizado por su vía de señales, sobre la apertura de unos canales de K^+ sensibles al ATP situados en la membrana de ciertas neuronas hipotalámicas (30). Al modificarse la corriente de K^+, su membrana experimenta una hiperpolarización, produciéndose una disminución de la capacidad funcional de esas células. Esto ocurre en unas neuronas específicas que son sensibles a la glucosa: responden a ella aumentando o disminuyendo su excitabilidad, dependiendo del tipo de célula; el efecto final de la insulina consistiría, pues, en modificar la capacidad de respuesta a la glucosa de estas neuronas glucosensibles (31). El estímulo de estas células se transmitiría al núcleo motor del nervio vago; de éste parten fibras aferentes hasta el hígado, gracias a las cuales se produciría la respuesta de este órgano. De hecho, es sabido que la resección de la rama hepática de ese nervio ocasiona una disminución del efecto inhibitorio de la insulina sobre la producción hepática de glucosa (revisión en 28).

3. Regulación del crecimiento, desarrollo y supervivencia de las células nerviosas

En cultivos de estirpes celulares de origen nervioso se ha comprobado que la insulina aumenta los niveles de α y β-tubulina, así como la formación de neuritas (32). Estos resultados sugieren que la hormona podría desempeñar algún papel regulador durante el desarrollo del SNC; de hecho, en neuronas cultivadas pro-

cedentes del cerebro fetal de la rata se ha comprobado que la insulina estimula el crecimiento axonal (33). A pesar de estos datos, lo cierto es que el papel de la hormona en este sentido no ha sido demostrado aún *in vivo* en los mamíferos.

Existen numerosos datos indicativos de que la insulina actúa como factor neurotrófico, interviniendo en la regulación de la muerte y supervivencia neuronales. Eso se ha demostrado en cultivos de células corticales y de cortes de tejido cerebelar (34, 35). También *in vitro* se ha visto que las neuronas que carecen del receptor de insulina son más sensibles a los agentes inductores de la apoptosis, una prueba de la importancia que tiene esta hormona como agente neuroprotector. A pesar de estos resultados, se sabe que el SNC del ratón sometido a un *knock-out* específicamente neuronal del receptor de insulina (ratón NIRKO) experimenta un desarrollo correcto; esto se explica suponiendo que otros factores neurotróficos distintos a esta hormona ejercerán efectos compensatorios (36).

Es bien sabido que en los tejidos periféricos se requiere la activación de las vías de señales que implican a PI3k y Akt para que se produzcan los efectos anti-apoptóticos de la insulina. En diversos trabajos se ha llegado a esta misma conclusión con respecto a las células neuronales y gliales, tanto las situadas en la periferia como las centrales; concretamente, la Akt parece un punto de convergencia crucial de diversos factores que promueven la supervivencia neuronal (revisado en 37). En parte, ello se debe a que la estimulación de esta kinasa induce la inhibición de una serie de proteínas implicadas en la maquinaria apoptótica neuronal y, además, impide la actividad transcripcional de p53, factor fuertemente apoptótico. Por otra parte, esa estimulación conduce a la inactivación de los factores de transcripción de tipo FoxO, cuyo papel como inductores de la apoptosis está bien demostrado (38). Por el contrario, la activación de la vía de las MAP kinasas, especialmente de las ERK, favorece la muerte neuronal (39). Lo cierto es que la implicación de la insulina en la regulación de la supervivencia y apoptosis de las células nerviosas todavía no está bien aclarada. Hay una estrecha interdependencia entre las dos vías de señales indicadas (PI3k-Akt y MAPK) y ello explica la complejidad de los efectos globales de esta hormona (y de otros factores de crecimiento) sobre esos procesos celulares.

4. Efectos sobre las funciones cognitivas

A) *Observaciones y evidencias experimentales:*

La presencia de la insulina y de sus receptores en las regiones cerebrales que intervienen en las actividades intelectuales superiores sugiere que esta hormona ejerce algún tipo de acción sobre las funciones cognitivas. Las que más se han

considerado al respecto son la memoria y el aprendizaje y por ello se han estudiado en particular la corteza y el hipocampo, sobre todo este último porque se trata de una región clave para la consolidación de acontecimientos y pautas de conducta en la memoria. Existen muchas observaciones publicadas sobre los efectos de la insulina en ese sentido, tanto en modelos experimentales como en el propio ser humano y bajo diferentes circunstancias: salud, algunos estados patológicos y envejecimiento. Cuando la hormona se administra por vía sistémica, la interpretación de los resultados es difícil debido a que el cuadro de hipoglucemia inducido enmascara los posibles efectos centrales directos; de ahí que en este tipo de estudios sea preferible inyectar la hormona por vía intracraneal en el tercer ventrículo. Con ese tipo de aproximación, se ha comprobado que la insulina aumenta en las ratas la capacidad para retener y consolidar pautas de conducta previamente aprendidas (40). También en estos animales se ha visto que algunas actividades de aprendizaje, como las que se investigan en el laberinto de Morris, conllevan incrementos en la expresión del receptor de insulina y de su vía de señales en el hipocampo (41-43). Se sabe que las pérdidas de memoria derivadas de lesiones isquémicas en esa estructura pueden evitarse mediante la administración de insulina (44). Un equipo de investigación iraní ha descrito que la inyección directa de esta hormona en la región dorsal del hipocampo de ratas facilita la memorización de tareas sencillas (45). Recientemente, un grupo coreano ha demostrado que los extractos de ciertas plantas medicinales son capaces de incrementar la memoria y activar simultáneamente la fosforilación del receptor de insulina y de proteínas de su vía de señales, como las ERK 1/2 (una MAP kinasa), en el hipocampo de roedores (46).

Es ilustrativo destacar un modelo experimental particularmente útil para ratificar la implicación de la insulina en las funciones superiores. Consiste en la inyección de estreptozotocina directamente en el cerebro. Este compuesto (un derivado de la glucosamina-nitrosourea) tiene una estructura similar a la glucosa; debido a ello, cuando se administra por vía sistémica es internalizada por las células β mediante el GLUT-2 y entonces ejerce dos efectos: metila el DNA y produce especies oxidativas altamente reactivas, ante las cuales las células β tienen poca capacidad de defensa, de modo que acaban muriendo. De ahí el uso clásico y generalizado de la estreptozotocina para desarrollar modelos experimentales de diabetes de tipo 1. Sin embargo, en algunos estudios sobre los efectos de la insulina en el SNC este compuesto se ha utilizado con otro objetivo: cuando se inyecta una dosis baja directamente en el cerebro, la estreptozotocina impide la unión de la insulina a sus receptores, de modo que se induce una resistencia central a esta hormona. En consecuencia, se trata de un modelo útil para estudiar qué ocurre en el SNC cuando se bloquean las acciones insulínicas.

Pues bien: se ha demostrado que en esas condiciones se producen déficits en la memoria, dificultades en el aprendizaje y alteraciones de la conducta (47). De estos resultados puede deducirse que para el ejercicio de esas funciones se requieren las acciones centrales de la insulina.

En cuanto al ser humano, está comprobado que si la insulina se administra por vía sistémica pero evitando que aparezca su efecto hipoglucemiante mediante la infusión simultánea de glucosa, se produce una mejoría en algunas funciones superiores como la memoria y la atención selectiva (48). Recientemente se ha señalado la posibilidad de que existan diferencias en la intensidad de este tipo de efectos cognitivos asociados a la insulina en relación con el sexo; se ha visto que son mayores en las mujeres que en los hombres. En cambio, con respecto a sus efectos anorexigénicos ocurre lo contrario: son más intensos en los hombres (49). No se sabe la causa de estas diferencias, pero se ha apuntado la posibilidad de que estén relacionadas con la actividad de los estrógenos en el SNC (50).

B) *Posibles mecanismos moleculares:*

Se ha sugerido que los efectos centrales de la estreptozotocina descritos en los apartados anteriores se deban a una disminución del metabolismo de la glucosa en las células nerviosas, derivado de la falta de acción insulínica; esta situación reduciría la energía disponible (47, 51). Es una propuesta basada en el hecho de que en ciertas regiones del SNC implicadas en las facultades superiores está presente el GLUT-4 y en la posibilidad de que la insulina induzca también en ellas la translocación de este transportador -como en los adipocitos y la fibra muscular- con el aumento consecuente de la captación y uso de la glucosa; por ejemplo, se ha visto que la concentración de GLUT-4 situado en la membrana plasmática de las células del hipocampo se encuentra disminuida en ratas obesas Zucker (42). Sin embargo, como ya se ha indicado, la concentración de este transportador es muy baja en el tejido nervioso; de ahí que aunque su translocación y los efectos derivados de ella no puedan descartarse, probablemente sean modestos. Por lo tanto, probablemente haya que considerar otros tipos de procesos que actúen como mediadores de la acción insulínica sobre las funciones cognitivas. Para comprender bien qué tipo de procesos podrían ser la base de esa acción hormonal hay que conocer en sus líneas generales los mecanismos moleculares en que se basa la función de la memoria.

El mecanismo mejor conocido por el cual un acontecimiento concreto se queda fijado en la memoria consiste en una modificación de circuitos neuronales basada en los procesos denominados LTP (*Long Term Potentiation*) y LTD

(*Long Term Depresion*) (52). Aunque ambos han sido extensamente estudiados durante los últimos años -sobre todo en algunas regiones del hipocampo, como la CA1, en donde abundan las neuronas glutamatérgicas- las bases experimentales que apoyan su participación en la consolidación de la memoria aún son débiles; sin embargo, permiten considerar hipótesis muy interesantes. En los procesos de LTP y LTD está involucrado el glutamato, que es el principal neurotransmisor excitador del SNC, así como dos de sus diferentes tipos de receptores: AMPA y NMDA, ambos asociados a canales iónicos. Los receptores de tipo AMPA son los más importantes en relación con la transmisión sináptica basal y rápida. Cuando el glutamato secretado al medio desde la membrana presináptica llega a la neurona postsináptica se une a ellos y se produce la intensificación de una corriente de Na^{+} hacia el interior de esa neurona, que entonces experimenta una despolarización. Este acontecimiento es la base del funcionamiento del otro tipo de receptor, el NMDA; éstos contribuyen poco a la transmisión sináptica basal, porque en esa condición su canal iónico se encuentra bloqueado por un Mg^{++}; pero al despolarizarse la neurona postsináptica, este catión es desplazado del receptor y ello, junto con la unión del glutamato, determina una entrada de Ca^{++} en esa neurona. La consecuencia más importante es que se estimula la actividad de muchas vías metabólicas que dependen de este catión.

El proceso de LTP se basa en esos acontecimientos moleculares descritos. Se produce cuando la neurona presináptica excita a la postsináptica de manera prolongada y repetitiva, es decir, dirigiéndole muchos impulsos de elevada frecuencia; en ese caso, el estado despolarizado de la neurona postsináptica queda reforzado, se convierte en duradero. Esto implica una intensificación de la entrada de Ca^{++} en ella, de modo que las consecuencias estimulantes sobre las vías metabólicas dependientes de este catión se prolongan en el tiempo; dicho de otro modo: la información se conserva, se consolida en la memoria. La LTD es un proceso compensatorio, para facilitar que en la neurona postsináptica sometida previamente a una LTP se produzca una disminución de la eficacia de la transmisión, para que la actividad de esa célula regrese al nivel previo a su excitación; de ese modo quedará preparada para almacenar información nueva. Las funciones de la memoria y el aprendizaje comprenden ambos tipos de procesos, LTP y LTD. Además, a ellos debe añadirse una remodelación de la morfología de las espinas dendríticas, lo cual está ligado a una serie de modificaciones experimentadas por el citoesqueleto. Todos estos hechos constituyen cambios duraderos, mantenidos durante largos plazos, producidos en las sinapsis. Esta capacidad que tienen las sinapsis de modificar la eficacia (la fuerza) de la transmisión se denomina “plasticidad” (53, 54).

En base a lo descrito en los párrafos anteriores, parece evidente que el desarrollo de los procesos de LTP y LTD está relacionado primariamente con los receptores AMPA de la membrana postsináptica. Existen dos mecanismos que permiten regular la neurotransmisión asociada a estos receptores: a) una modificación de la cantidad de ellos presente en la membrana y b) la fosforilación de sus subunidades componentes. Con respecto a lo primero, es bien sabido que los receptores AMPA están continuamente translocándose desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática y viceversa, mediante procesos de exocitosis y endocitosis que forman un reciclaje constitutivo. En este tráfico interviene una serie de proteínas que integran la maquinaria celular requerida para la exo- y endocitosis, así como para la fusión del receptor con la membrana plasmática y su anclaje a ella. Lógicamente, los cambios en la tasa de expresión de estas proteínas o en la intensidad de los procesos de exo- y endocitosis constituyen procedimientos importantes para modificar la eficacia de la transmisión sináptica, es decir, para regular la plasticidad neuronal. La LTP está asociada a un incremento de la densidad postsináptica de los receptores AMPA, mientras que la LTD se asocia a una disminución. La alteración en el número de receptores de glutamato puede tener una gran relevancia fisiopatológica; forma parte de la etiología molecular de algunas patologías neurológicas (55). Con relación a la fosforilación de las subunidades de los receptores AMPA se sabe que se trata de una modificación que incrementa la eficacia de su canal iónico durante la LTP, mientras que la desfosforilación durante la LTD la disminuye (56).

¿Qué acciones puede llevar a cabo la insulina sobre estos complejos procesos? Se sabe que esta hormona actúa sobre los receptores del glutamato. Concretamente, es capaz de inducir su redistribución subcelular, cambiando su concentración en la membrana plasmática (57, 58); en consecuencia, la insulina puede modular la neurotransmisión glutamatérgica. Por ello se ha propuesto que los efectos de esta hormona sobre estas funciones intelectuales se produzcan a través de su actuación sobre la sinapsis, implicando a este mecanismo (al menos en parte). En este sentido, Huang y col. han visto, en cortes de hipocampo de rata, que la insulina induce el proceso de LTD y que lo hace disminuyendo el número de subunidades del receptor AMPA situadas en la membrana de neuronas postsinápticas; además, este proceso depende de la fosforilación del receptor hormonal, de la activación de la PI3-kinasa y de un proceso de síntesis proteica (59). Otros autores han demostrado que la insulina induce la fosforilación de la subunidad GluR2 de los receptores AMPA en neuronas hipocampales, hecho que provoca su endocitosis y una disminución de la capacidad de excitación postsináptica (60). Recientemente, en neuronas cerebrales de ratón, se ha observado que la proteína transportadora de monocarboxilatos MCT2 y al-

gunas subunidades del receptor AMPA se encuentran asociadas entre sí; en ese mismo estudio se ha demostrado que la insulina influye sobre el tráfico de esas proteínas: incrementa su internalización, lo que conlleva una disminución del número de receptores en la membrana postsináptica (61).

Estos efectos de la insulina sobre la transmisión glutamatérgica no constituyen un concepto extraño; así, Ramsey y col. han demostrado que el IGF-1 (cuya disminución paulatina en plasma producida con la edad se ha relacionado con el declive cognitivo experimentado progresivamente durante el envejecimiento) incrementa la transmisión sináptica en el hipocampo de ratas y que ello ocurre mediante un mecanismo que implica a los receptores AMPA y a la actividad de PI3-kinasa (62). Por otra parte, la GH provoca aumentos en la expresión de subunidades del receptor de NMDA en el hipocampo y así favorece la inducción de LPT y mejora la capacidad de memoria (63).

INSULINA EN EL SNC Y ESTADOS PATOLÓGICOS

Se conocen varias patologías en cuya base etiológica se ha sugerido que se encuentren alteraciones de la función insulínica sobre el SNC (revisado en 19); a continuación se describe la posible implicación de la hormona en algunas de esas enfermedades.

1. Diabetes mellitus

Es bien sabido que en el curso de la diabetes mellitus se producen alteraciones que repercuten sobre muchos órganos periféricos. Aunque esa enfermedad nunca ha sido considerada como una patología neurológica hoy se acepta que algunas funciones radicadas en el SNC también pueden ser afectadas por ella, aunque se trata de una cuestión poco elaborada todavía. La variedad de efectos perniciosos sobre las funciones cognitivas y conductuales que se han ido describiendo en los pacientes de ambos tipos de diabetes constituyen una prueba de que esta patología tiene repercusiones negativas sobre ciertas funciones superiores del SNC; es posible, incluso, que esas consecuencias sean más numerosas que las bien conocidas complicaciones clásicas (por ejemplo, sobre la retina o los riñones) (revisado en 61). Se ha propuesto la expresión "encefalopatía diabética" para denominar al conjunto de alteraciones cerebrales asociado a esa patología (64, 65). Sin embargo, los pacientes diabéticos no son investigados rutinariamente con relación a posibles deterioros cognitivos y raramente

son tratados al respecto. Se ha sugerido que las alteraciones más directas de la diabetes sobre las capacidades superiores se establecerán principalmente en dos etapas: a lo largo del desarrollo cerebral y durante el periodo senil. A finales de los años 90 se demostró que la diabetes de tipo 2 constituía un factor de riesgo para la demencia, hecho que se relacionó con la hiperinsulinemia típica que experimentan los pacientes diabéticos; hoy se sabe que ese riesgo es dos veces superior al normal (66, 67).

En diferentes estudios se ha constatado que los niños diabéticos de tipo 1 obtienen puntuaciones más bajas que sus compañeros no enfermos, cuando se someten a pruebas para evaluar cualidades intelectuales como: inteligencia, capacidad de atención, memoria, etc.; esto explica que, con cierta frecuencia, el progreso escolar de estos niños sea peor que el de sus compañeros no diabéticos. Este tipo de consecuencias adversas está directamente relacionado con la precocidad de aparición de la enfermedad; de hecho, la edad de inicio es un factor que contribuye a predecir el grado de deterioro cognitivo (68, 69). Aunque tiene carácter anecdótico, es relevante el hecho de que los padres y profesores de niños diabéticos suelan apreciar una mejoría de su humor, comportamiento y capacidad de aprendizaje a partir del momento en que se establece la terapia con insulina y se controla la glucemia. Recientemente se ha publicado un trabajo piloto que confirma esas apreciaciones subjetivas; sin embargo, todavía no se han llevado a cabo estudios sistemáticos al respecto (70). Musen y col. han visto que en los pacientes de diabetes de tipo 1 se produce una disminución del número de dendritas en la materia gris, resultado que indica la existencia de un sustrato anatómico en todo este tipo de alteraciones (71). Por otra parte, se ha comprobado que la administración intranasal de insulina en ratones diabéticos revierte diversas alteraciones morfológicas y moleculares que aparecen en ciertas regiones cerebrales, así como el declive cognitivo de esos animales; esto sugiere la importancia que puede tener el tratamiento con insulina para frenar las alteraciones de la capacidad intelectual asociadas a la diabetes (72). Sin embargo, ese tratamiento debe estar muy bien ajustado porque el exceso de insulina puede repercutir negativamente sobre las funciones superiores, como se verá más adelante, al referirnos a la enfermedad de Alzheimer.

Los pacientes diabéticos de tipo 2 también experimentan una disminución de algunas funciones intelectuales, como el aprendizaje y la memoria (73, 74). Además, se sabe que el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento está significativamente incrementado en este tipo de enfermos. De hecho, una de las consecuencias a largo plazo de la diabetes de tipo 2 consiste en una reducción del volumen del hipocampo —lo cual podría estar directamente relacionado con

la disminución de la memoria- así como una atrofia parcial de la amígdala (74, 75). Diferentes estudios epidemiológicos han evidenciado que entre los diabéticos la probabilidad de desarrollar una depresión es superior a la del resto de la población; además, la gravedad de los síntomas suele ser mayor (76).

Dada la cantidad de alteraciones metabólicas asociadas a la diabetes mellitus, resulta complejo identificar los factores específicos que producen el deterioro cognitivo de los enfermos, o que contribuyen a él. Se han considerado varias posibilidades:

A) *Control deficiente de la glucemia*

Los pacientes diabéticos suelen experimentar situaciones de hipoglucemia y de hiperglucemia. Aunque algunos trabajos demuestran que la reiteración de hipoglucemias puede provocar secuelas neurológicas (77), los estudios publicados al respecto suelen ser poco consistentes (78). También pueden ser negativos los cuadros de hiperglucemia. Es bien conocido el efecto tóxico del exceso de glucosa sobre muchos tejidos periféricos, de modo que no sería extraño que también se produjera en el SNC. En ratas hiperglucémicas, por tratamiento con estreptozotocina, se ha demostrado la presencia de modificaciones en el hipocampo, una región que, como se ha indicado más atrás, es crucial para la integración del aprendizaje y la memoria: alteraciones anatómicas, disminución de la plasticidad neuronal (proliferación y neurogénesis), cambios neuroquímicos y cambios en la vía de señales insulínica (79). Es posible que los efectos de la hiperglucemia sean indirectos, estén asociados a las complicaciones microvasculares; éstas, ya de por sí pueden ocasionar deficiencias cognitivas.

B) *Alteración de las hormonas glucocorticoides*

Como es bien sabido, la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal que se produce típicamente en las situaciones de stress, conduce a un incremento agudo de la secreción de glucocorticoides; éstos, actuando sobre diferentes tejidos, permiten la adaptación adecuada a esas situaciones. Ahora bien: cuando los niveles de esas hormonas están elevados con carácter crónico, se producen muchos efectos negativos (80). Existen diferentes estudios acerca de las repercusiones de la diabetes de tipo 2 sobre el eje hipotalámico-hipofisario; en general estos trabajos muestran que los pacientes presentan niveles altos de cortisol en sangre. Esta hormona puede afectar negativamente a las funciones cognitivas

(81) y por eso su incremento ha sido correlacionado con las alteraciones que experimentan los pacientes diabéticos al respecto. Puesto que los glucocorticoides actúan sobre el metabolismo glucídico, la alteración del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal podría alterar el grado de control glucémico de estos enfermos, siendo éste un posible mecanismo explicativo de su deterioro intelectual (82).

2. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la patología neurodegenerativa más común en el ser humano. A finales de los 90 ya se había propuesto la idea de que el deterioro de las funciones mentales que padecen los enfermos de Alzheimer podría deberse a una alteración de las acciones insulínicas cerebrales. Por otra parte, las relaciones de esa enfermedad con la diabetes son profundas. Varios estudios de tipo epidemiológico han demostrado que la diabetes de tipo 2 es un factor de riesgo para ella (83) y también se ha constatado que los enfermos de Alzheimer son más vulnerables para la diabetes de tipo 2 (84). La enfermedad de Alzheimer es una demencia senil: la mayor parte de los afectados son personas de edad avanzada. Dado que el envejecimiento conlleva una reducción natural de la concentración cerebral de insulina y de sus receptores, se ha sugerido que la magnitud de estos descensos esté directamente relacionada con la intensidad con que se altera la capacidad cognitiva en las personas mayores (85). En el caso de los pacientes de Alzheimer, a la reducción en los niveles de insulina y receptores en el SNC, se añade una menor capacidad funcional de la vía de señales, ya que se produce una disminución de muchos de sus componentes (72); se ha sugerido que así se producirían deficiencias en el metabolismo cerebral de la glucosa y que esto contribuiría a la sintomatología propia de estos enfermos (86). De ahí que la enfermedad de Alzheimer pueda considerarse como una especie de "diabetes cerebral" derivada de a una resistencia central a la insulina (87, 88); algunos autores han propuesto que se denomine *diabetes de tipo 3* (72).

En algunos casos se ha constatado que la administración de la insulina produce una mejoría en la memoria de los enfermos de Alzheimer (90). A pesar de esa evidencia, lo cierto es que la correlación entre la insulina y la enfermedad de Alzheimer no está clara porque, paradójicamente, también se ha visto que los antidiabéticos orales —que aumentan la secreción pancreática de insulina— incrementan la incidencia de enfermedad de Alzheimer y que a veces los diabéticos de tipo 2 tratados con insulina presentan un riesgo mayor para esta enfermedad. De hecho, en algunos estudios epidemiológicos se ha puesto en evidencia

que los altos niveles de insulina en plasma *per se*, sin patologías asociadas, están relacionados con una disminución de la capacidad cognitiva (91).

El enzima que degrada la insulina se conoce por las siglas IDE (*Insulin Degrading Enzyme*). No es específico, ya que actúa sobre otros varios sustratos; entre ellos, también degrada al péptido β-amiloide, una sustancia que se acumula fuera de las células nerviosas en diferentes áreas del cerebro de los enfermos de Alzheimer. El IDE está codificado por un gen situado en el cromosoma 10, en una región que está asociada a la diabetes de tipo 2 en algunos grupos humanos y, también, a algunas variedades de la enfermedad de Alzheimer; por ello, el IDE constituye un interesante nexo común entre las dos patologías. Se ha demostrado que en los ratones que experimentan una doble deleción del gen que codifica para IDE se produce una elevación de los depósitos de β-amiloide cerebral; por el contrario, un aumento de la actividad del IDE disminuye esos depósitos y protege frente a la enfermedad de Alzheimer. Dado que el IDE tiene varios sustratos que compiten para ser degradaos por éste, se ha sugerido que un desequilibrio en la proporción de esos sustratos podría ser la base etiopatogénica en la enfermedad de Alzheimer o en la diabetes de tipo 2; así, un incremento de la concentración cerebral de insulina podría disminuir la degradación del β-amiloide, lo que conduciría a un aumento de su concentración y de sus efectos neurotóxicos (92, 93).

Otro mecanismo que podría actuar como nexo entre la enfermedad de Alzheimer y la diabetes se refiere a la fosforilación de tau, una proteína que forma parte de los microtúbulos integrantes del citoesqueleto. En esos enfermos, tau se encuentra anormalmente acumulada dentro de las neuronas, formando los llamados *ovillos neurofibrilares*. Esta precipitación de tau se produce como consecuencia de un exceso de fosforilación. Una de los principales enzimas que intervienen en la formación de fosfo-tau es la GSK3, cuya actividad se regula a su vez por fosforilación, aunque en este caso determinando una reducción de dicha actividad. La kinasa Akt, de la vía insulínica, puede fosforilar a GSK3. Por lo tanto, una disminución de la señal central de la insulina implicaría una menor actividad de Akt y, en consecuencia, una menor fosforilación de GSK3. Este cambio induciría un incremento en la actividad de dicha kinasa y ello podría ser causa de una fosforilación excesiva de tau y de la formación de los *ovillos neurofibrilares* (94).

Una de las alteraciones características que se observan en el cerebro de los enfermos de Alzheimer es un cuadro crónico de stress oxidativo. Pues bien: se ha demostrado que el deterioro de la señalización insulínica provoca ese tipo de stress en las neuronas. Se trata de una situación potencialmente grave, ya que el metabolismo cerebral es intenso y conduce a la formación de muchas especies oxidativas; sin embargo, las neuronas tiene pocas defensas antioxidantes (95).

3. Insulina y tumores en el SNC

La activación excesiva de los receptores de tipo tirosín-kinasa está implicada en los procesos de malignización, en ciertas variedades de cáncer. El receptor de insulina pertenece a esa clase de kinasas y por eso no es extraño que diferentes estudios epidemiológicos hayan señalado que las situaciones de insulino-resistencia conllevan un incremento del riesgo de neoplasias, dado que suelen cursar con cuadros de hiperinsulinemia: los altos niveles de hormona podrían dar lugar a una activación excesiva de los receptores presentes en algunos tejidos. Sin embargo, debe señalarse que las relaciones precisas entre insulina y crecimiento neoplásico todavía no son bien conocidas (96).

Con respecto a esta hormona y sus efectos sobre el sistema nervioso, se ha visto que su receptor se encuentra sobreexpresado en algunas variedades celulares tumorales de origen nervioso; se trata de la isoforma de tipo A, la que se considera fetal -como se ha indicado más atrás-. Estas neoplasias suelen ser particularmente graves, debido a su elevado potencial de crecimiento (97). Por otra parte, se ha comprobado que en algunos cánceres del SNC las células tumorales son capaces de producir insulina; una vez segregada, esta hormona ocupa los receptores presentes en ellas y estimula de manera autocrina su crecimiento, lo que causa una elevada malignidad; esto explica la poca capacidad de respuesta a la quimioterapia observada en estos tumores (98).

BIBLIOGRAFÍA

(1) Laron, Z. (2009) Insulin and the brain. *Arch. Physiol. Biochem.* 115(2): 112-116.

(2) Margolis, R.U., Altszuler, N. (1967) Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* 215(5108):1375-1376.

(3) Havrankova, J., Roth, J., Brownstein, M.J. (1979) Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents. *J. Clin. Invest.* 64(2):636-642.

(4) Giddings, S.J., Chirgwin, J., Permutt, M.A. (1985) Evaluation of rat insulin messenger RNA in pancreatic and extrapancreatic tissues. *Diabetol.* 28(6): 343-347.

(5) Woods, S.C., Seeley, R.J., *et al.* (2003) Insulin and the blood-brain barrier. C*urr. Pharm. Des.* 9(10): 795-800.

(6) Banks, WA. (2006) Denial versus dualism: the blood-brain barrier as an interface of the gut-brain axis. *Endocrinol.* 147(6): 2609-2610.

(7) Banks, W.A. (2004) The source of cerebral insulin. *Europ. J. Pharmacol.* 490(13): 5-12.

(8) Miller, DW., Keller, B.T., Borchardt, R.T. (1994). Identification and distribution of insulin receptors on cultured bovine brain microvessel endothelial cells: possible function in insulin processing in the blood-brain barrier. *J. Cell. Physiol.* 161(2): 333-341.

(9) Tagliamonte, A., DeMontis, M.G., *et al.* (1976) Role of insulin in the transport of tyrosine and tryptophan from blood to brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 69:89-94.

(10) Kastin, A.J., Akerstrom, V. (2000) Fasting but not adrenalectomy, reduces transport of leptin into the brain. *Peptides* 21: 679-682.

(11) Pan, W., Yu, Y., *et al.* (2005) Permeation of growth hormone across the blood-brain barrier. *Endocrinology* 146(11): 4898-4904.

(12) McKinley, M.J., Oldfield, B.J. (1998) The brain as an endocrine target for peptide hormones. *Trends Endocrinol. Metab.* 9(9): 349-354.

(13) Schwartz, M.W., Figlewicz, D.P., *et al* (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance *Endocr. Rev.* 13(3): 387-414.

(14) Schulingkamp, R.J., Pagano, T.C., *et al.* (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24: 855-872.

(15) Nielsen, D., Gyllberg, H. *et al.*, (2004) Increased levels of insulin and insulin-like growth factor-1 hybrid receptors and decreased glycosylation of the insulin receptor α- and β-subunits in scrapie-infected neuroblastoma N2a cells. *Biochem J.* 380: 571-579.

(16) Brüning, J.C., Gautam, D., *et al.* (2000) Insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289(5487): 2122-2125.

(17) van der Heide, L.P., Ramakers, G.M.J., Smidt, M.P. (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Progress in Neurobiol.* 79(4): 205-221.

(18) Dringer, R., Hamprecht, B. (1992) Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *J. Neurochem* 58(2): 511-517.

(19) Park, C.R. (2001) Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci. Behav.* 25(4): 311-323.

(20) Vannucci, S.J., Koehler-Stec, E.M., *et al.* (1998) GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res.* 797(1): 1-11.

(21) Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: patologías. Publicado por el Instituto de España y Real Academia de Farmacia. Monografía XVIII, 2005, Madrid. Ed.: A.M. Pascual-Leone.

(22) Jobst, E.E., Enrior, J.P., Cowley, M.A. (2004) The electrophysiology of feeding circuits. *TRENDS Endocrinol. Metab.* 15(10): 488-499.

(23) Mendieta-Zerón, H., López, M., Diéguez, C. (2007) Regulación hipotalámica de la ingesta por nutrientes y estado metabólico. *Rev. Esp. Obes.* 5(6): 351-362.

(24) Münzberg, H., Björnholm, M., *et al.* (2005) Leptin receptor and mechanisms of leptin resistance. *Cell. Mol. Life Sci.* 62(6): 642-652.

(25) Niswender, K.D., Baskin, D.G., Schwartz, M.W. (2004) Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *TRENDS Endocrinol. Metab.* 15(8): 362-369.

(26) Obicis, S., Feng, Z., *et al.* (2002) Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperfagia and insulin resistance in rats *Nat. Neurosci.* 5(6): 566-572.

(27) Obici, S., Zhang, B.B., *et al.* (2002) Hypothalamic insulin signalling is required for inhibition of glucose production. *Nat. Med.* 8(12): 1376-1382.

(28) Girard, J. (2006) The inhibitory effects of insulin on hepatic glucose production are both direct and indirect. *Diabetes* 55(2): S65-S69.

(29) Demuro, G., Obici, S. (2006) Central nervous system and control of endogenous glucose production. *Current Diab. Reports* 6(3): 188-193.

(30) Pocai, A., Lam, T.K., *et al.* (2005) Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434(7036): 1026-1031.

(31) Cotero, V.E., Routh, V.H. (2009) Insulin blunts the response of glucose-excited neurons in the ventrolateral-ventromedial hypothalamic nucleus to decreased glucose. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296(5): E1101-1109.

(32) Wang, C., Li, Y., *et al.* (1992) Effect of insulin and insulin-like factors on neurofilament mRNA and tubulin mRNA content in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 13(4): 289-300.

(33) Schechter, R.; Abbound, M.; Jonson, III G. (1999) Brain endogenous insulin effects on neurite growth with fetal rat neuron cell cultures. *Dev. Brain Res.* 116(2): 159-167.

(34) Ryu, B.R., Ko, H.W., *et al.* (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-1. *J. Neurobiol.* 39(4): 536-546.

(35) Tanaka, M., Sawada, M., *et al.* (1995) Insulin prevents apoptosis of external granular layer neurons in rat cerebellar slice culture. *Neurosci. Lett.* 199(1): 37-40.

(36) Schubert, M., Gautman, D., *et al.* (2004) Role of neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(9): 3100-3105.

(37) Rodgers, E.E., Theibert, A.B. (2002) Functions of PI3-kinase in development of the nervous system. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20(3-5): 187-197.

(38) Zheng, W.H., Kar, S., Quirion, R. (2002) Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* 62(2): 225-233.

(39) Haddad, J.J. (2005) N-Methyl-D-aspartate (NMDA) and the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways: a revolving neurochemical axis for therapeutical intervention? *Prog. Neurobiol.* 77(4): 252-282.

(40) Park, C.R, Seeley, R.J., *et al.* (2000) Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol. Behav.* 68(4): 509-514.

(41) Zhao, W., Chen, H., *et al.* (1999) Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signalling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol. Chem.* 274(49): 34893-34902.

(42) Dou, J.T., Chen, M., *et al.* (2005) Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem.* 12(6): 645-655.

(43) Winocur, G., Greenwood, C.E., *et al.* (2005) Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in animal models of insulin-resistance and obesity. *Behav. Neurosci.* 119(5): 1389-1395.

(44) Voll, C.L., Whishaw, J.Q., Aver, R.N. (1989) Postischemic insulin reduces spatial learning deficit following transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 20(5): 646-651.

(45) Babri, S., Badie, H.G., *et al.* (2007) Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats. *Brain Cogn.* 64(1): 86-91.

(46) Kim, S-J., Lee, K. (2008) Extracts of Liriposis tuber protect AMPA induced brain damage and improve memory with the activation of insulin receptor and ERK I/II. *Phytoterapy. Res.* 22(11): 1450-1457.

(47) Lanaert, H., Hoyer, S. (1998) Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci.* 112(5): 1199-1208.

(48) Kern, W., Peters, A. *et al.* (2001) Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinol.* 74(4): 270-280.

(49) Benedict, C., Kern, W., *et al.* (2008) Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory-improving effects of intranasal insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(4): 1339-1344.

(50) Daniel, J.M. (2006) Effects of oestrogen on cognition: what have we learned from basic research? J. *Neuroendocrinol.* 18(10): 787-795.

(51) Hoyer, S., Lanaert, H. (2007) Long-term abnormalities in brain glucose/energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau protein. *J. Neural. Transm. Suppl.* (72): 195-202.

(52) Feldman, D.E. (2009) Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annu. Rev. Neurosci.* 32:33-55.

(53) Wang, Y. (2008) Probing the role of AMPAR endocytosis and long-term depression in behavioural sensitization: relevance to treatment of brain disorders, including drug addiction. *British J. Pharmacol.* 153(S1): S389-S385.

(54) Lau, C.G., Zukin, R.S. (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev.* 8(6): 413-426.

(55) Man, H.Y., Lin, J.W. *et al.* (2000) Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25(3): 649-662.

(56) Song, I., Huganir, R.L. (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 25(11): 578-588.

(57) Skeberdis, V.A., Lan, J. *et al.* (2001) Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D-aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(6): 3561-3566.

(58) Vetiska, S.M., Ahmadian, G. *et al.* (2007) GABAA receptor-associated phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced recruitment of postsynaptic GABAA receptors. *Neuropharmacol.* 52(1): 146-155.

(59) Huang, C.C., Lee, C.C., Hsu, K.S. (2004) An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurochem.* 89(1): 217-231.

(60) Ahmadian, G., Ju, W., *et al.* (2004) Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocitosis and LTD. *EMBO J.* 23(5): 1040-1050.

(61) Pierre, K., Chatton, J.Y., *et al.* (2009) Linking supply to demand: the neuronal monocarboxylate transporter MCT2 and the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazol-propionic acid receptor Glu2/3 subunit are associated in a common trafficking process. *Eur. J. Neurosci.* 29(10): 1951-1963.

(62) Ramsey, M.M., Adams, M.M., *et al.* (2005) Functional characterization of des-IGF-1 action at excitatory synapses in the CA1 region of rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 94(1):247-254.

(63) Le Grevès, M., Zhou, Q., *et al.* (2006) Growth hormone replacement in hypophysectomized rats affects spatial performance and hippocampal levels of NMDA receptor subunit and PSD-95 gene transcript levels. *Exp. Brain Res.* 173(2): 267-273.

(64) Reagan, L.P. (2007) Insulin signalling effects on memory and mood. *Current Opin. Pharmacol*. 7(6): 633-637.

(65) Alvarez, E.O., Beauquis J. *et al*. (2009) Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behav Brain Res*. 198(1): 224-230.

(66) Ott ,A., Stolk, R.P., *et al*. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia – The Rotterdam Study. *Neurology* 53(9): 1937-1942.

(67) Cukierman, T., Gerstein, H.C., Williamson, J.D. (2005) Cognitive decline and dementia in diabetes –systematic overview of prospective observational studies. *Diabetol*. 48(12): 2460-2469.

(68) Dahlquist, G., Källén, B. Swedish Childhood Diabetes Study Group. (2007) School performance in childern with type 1 diabetes: a population-based register study. *Diabetol*. 50(5): 957-64.

(69) Schoenle, E.J., Schoenle, D., *et al*. (2002) Impaired intellectual development in children with type 1 diabetes: association with HBA(1c), age at diagnosis and sex. *Diabetol*. 45(1): 108-14.

(70) Knight, S., Nostham, E., *et al*. (2009) Improvements in cognition, mood and behaviour following commencement of continuous subcutaneous insulin infusion therapy in children with type 1 diabetes mellitus: a pilot study. *Diabetol*. 52(2): 193-198.

(71) Musen, G., Lyoo, I.K., *et al*. (2006) Effects of type 1 diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. *Diabetes* 55(2): 326-333.

(72) Steen, E., Terry, B.M., *et al*. (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signalling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes? *Alzheimer Dis*. 7(1): 63-80.

(73) van Harten, B., de Leeuw, F.E., *et al*. (2006) Brain imaging in patients with diabetes: a systemic review. *Diabetes Care* 29(11): 2539-2548.

(74) Stewart, R., Liolitsa, D. (1999) Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet. Med*. 16(2): 93-112.

(75) Den Heijer, T., Vermeer, S.E., *et al*. (2003) Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetol*. 46(12): 1604-1610.

(76) Lustman, P.J., Clouse, R.E. (2005) Depression in diabetic patients: the relationship between mood and glycemic control. *J. Diabetes Complications* 19(2): 113-122.

(77) Deary, I.J., Frier, B.M. (1996) Severe hypoglycaemia and cognitive impairment in diabetes. *BMJ* 313(7060): 767-768.

(78) Northam, E.A., Anderson, P.J., *et al*. (2001) Neuropsychological profiles of children with type 1 diabetes 6 years after disease onset. *Diabetes Care* 24(9): 1541-1546.

(79) Kamal, A., Biessesl, G.J., *et al*. (2000) Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and aging. *Diabetol*. 43(4): 500-4506.

(80) McEwen, B.S. (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*. 886(1-2): 172-89.

(81) Starkman, M.N., Gebarski, S.S., *et al*. (1992) Hippocampal formation volume, memory dysfunction and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol. Psychiatry* 32(9): 756-765.

(82) Bruehl, H., Rueger, M., *et al*. (2007) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and dysregulation and memory impairment in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 92(7): 2439-2445.

(83) Zhu, G., Perry, G., Smith, M.A. (2005) Insulin signalling, diabetes and risk of Alzheimer disease. *J. Alzheimer Dis*. 7(1): 81-84.

(84) Tschanz, J.T., Corcoran, C., *et al*. (2004) Dementia: the leading predictor of death in a defined elderly population: the Cache County study. *Neurology* 62(7): 1156-1162.

(85) Stolk, R.P., Breteler, M.M., *et al*. (1997) Insulin and cognitive function in an elderly population. The Rotterdam Study. *Diabetes Care*. 20(5): 792-795.

(86) Blass, J.P. (2001) Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *Neursoci. Res*. 66 (5): 851-856.

(87) Frölich, L., Blum-Degen, D., *et al*. (1998) Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer disease. *J. Neural. Transm*. 105(4-5): 423-438.

(88) Craft, S. (2007) Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr. Alzheimer Res*. 4(2): 147-152.

(89) Steen, E., Terry, B.M., *et al*. (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signalling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers Dis*. 7(1): 63-80.

(90) Dhamoon, M.S., Noble, J.M., Craft, S. (2008) Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology* 70(6): 440-448.

(91) Young, S.A., Mainous, A.G., Carnemolla, M. (2006) Hyperinsulinemia and cognitive decline in a middles-aged cohort. *Diabetes Care* 29(12): 2688-2693.

(92) Qiu, W.Q., Folstein, M.F. (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-b peptide in Alzheimer disease: a review and hypothesis. *Neurobiol. Aging* 27(2): 190-198.

(93) Leissring, M.A, Farris, W., *et al*. (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology and premature death. *Neuron* 40(6): 1087-1093.

(94) Jolivalt, C.G., Lee, C.A., *et al*. (2008) Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer disease and correction by insulin. *J. Neurosci. Res*. 86(15): 3265-3274.

(95) Xu, J., Yeon, J.E., *et al*. (2003) Ethanol impairs insulin-stimulated neuronal survival in the developing brain: role of PTEN phosphatase. *J. Biol. Chem*. 278(29): 26929-26937.

(96) Denley, A., Wallace, J.C., *et al*. (2003) The insulin receptor isoform exon 11 – (IR A) in cancer and other diseases: a review. *Horm. Metab. Res*. 35(11-12): 778-785.

(97) Frasca, F., Pandini, G., *et al*. (2008) The role of insulin receptors and IGF-1 in cancer and other diseases. *Arch. Physiol. Biochem*. 114(1): 23-37.

(98) Acaro, A; Doepfner, KT., *et al*. (2007) Novel role for insulin as an autocrine growth factor for malignant brain tumour cells. *Biochem. J*. 406(1): 57-66.

7. Homeostasis cerebral e IGF-I

IGNACIO TORRES ALEMAN

Profesor de Investigación CSIC, Director del Instituto Cajal del CSIC
Instituto Cajal, CSIC y Ciberned. Madrid.

RESUMEN

Aunque los IGFs, y mas concretamente el IGF-I son conocidos sobretodo por su implicación fundamental en el eje somato-trópico controlado por la hormona de crecimiento hipofisaria, en los últimos años se ha ido desvelando un papel también muy importante del IGF-I a nivel cerebral. Quizás lo más llamativo de este nuevo aspecto de la fisiología del IGF-I es que sea el IGF-I circulante, de procedencia mayoritariamente hepática, el que tenga un efecto neuroactivo. Si bien el cerebro adulto produce pequeñas cantidades de IGF-I, es el de origen periférico el que resulta esencial para un funcionamiento adecuado de este órgano. De hecho, el papel del IGF-I cerebral en la fisiología neural todavía no está claro, revelando su importancia al parecer sólo en condiciones de alteración de la homeostasis. Sin embargo, la ausencia de IGF-I circulante genera un enorme impacto neurológico, produciendo desordenes anatómicos, bioquímicos y conductuales. Quizás lo mas llamativo del IGF-I sérico sea su papel sobre funciones cerebrales superiores tales como el aprendizaje y la memoria. Esta conexión entre periferia y sistema nervioso central implica el paso del IGF-I circulante al cerebro a través de las barreras hemato-encefálicas, hecho conocido desde hace años pero aún no aceptado plenamente ya que se considera que estas barreras son impermeables a la mayor parte de las proteínas sanguíneas.

El IGF-I es un cito-protector de amplio espectro, también en el cerebro. Es además esencial para el mantenimiento tisular, encargándose de mantener una población celular acorde a las demandas funcionales. Contribuye al soporte ener-

gético celular de dos maneras, manteniendo el árbol vascular cerebral y por lo tanto asegurando un aporte de oxígeno y nutrientes, y regulando el metabolismo celular como agente anabólico por excelencia. Además ejerce funciones mas específicas del tejido neural. En concreto regula la excitabilidad neural -modula una enorme diversidad de canales iónicos, y diversos sistemas de neurotransmisión. De esta forma contribuye directamente al mantenimiento de las funciones superiores cerebrales que se traducen en una influencia directa sobre las capacidades cognitivas.

Pero si algo define la neurobiología de este factor tan pleiotrópico es su papel central en la homeostasis cerebral. Es por eso que cualquier enfermedad neurológica presenta alteraciones en el sistema IGF-I. En situaciones de alteración de la homeostasis siempre se da una respuesta reactiva no sólo del IGF-I, también de otros muchos factores neuroprotectores. Pero es el IGF-I el encargado de orquestar en gran medida la respuesta adaptativa. De esta manera el IGF-I se puede considerar un elemento maestro en la homeostasis cerebral.

ABSTRACT

Although the IGFs, and particularly IGF-I, form part of the somatotropic axis governed by pituitary growth hormone, during the last years an important role of IGF-I in the brain has also been unveiled. Probably the most striking aspect of this newly described physiological role of IGF-I is that it is blood-borne IGF-I, originated in the liver that is neuroactive. Although the brain also produces small amounts of IGF-I, it appears that it is systemic IGF-I which is crucial for proper brain function. Indeed, the role of brain IGF-I in neural physiology is not yet clear, showing neuroprotective activity only under conditions of compromised homeostasis. Conversely, the lack of serum IGF-I elicits substantial neurological impairments at structural, biochemical and even behavioural levels. Even more striking is the involvement of circulating IGF-I in higher brain functions such as learning and memory. This connection between the periphery and the central nervous system requires passage of serum IGF-I into the brain across the blood-brain barriers (BBBs). Although this traffic of serum IGF-I to the brain was documented years ago, it was mostly neglected because the BBBs are sealed against the majority of blood-borne proteins.

IGF-I is a wide spectrum cyto-protectant, also in the brain. IGF-I is also important in tissue remodelling, maintaining the size of cell populations in accordance to functional demands. IGF-I contributes to the energy supply of brain

cells in at least two ways. It keeps brain vasculature and in this way secures oxygen and nutrient supply, and modulates cell metabolism as a prominent anabolic agent. In addition, IGF-I exerts brain-specific actions. Thus, IGF-I regulates neuronal excitability through its ability to modulate a great variety of ionic channels and several neurotransmitter systems. In this fashion IGF-I contributes in maintaining higher brain functions which translates into a direct influence on cognitive status.

However, if there is something that defines the neurobiology of this pleiotropic factor is its key role in brain homeostasis. This is the reason of disturbances in the IGF system in almost any neurological illness. Under compromised homeostasis the adaptive response includes not only IGF-I but many other neuroprotective factors. But it appears that it is IGF-I that largely orchestrates this adaptive process. Hence, we may pose IGF-I as a master regulator of brain homeostasis.

INTRODUCCIÓN

La familia de los péptidos insulínicos tiene una antigüedad de al menos 600 millones de años [1]. Los primeros organismos conocidos que expresan estas proteínas lo hacen ya en distintos grupos neuronales. Es por lo tanto desde el principio de la filogenia que estos péptidos tienen un evidente componente neural. Y a lo largo de la escala filogénica este papel neural parece que ha ido expandiéndose junto con el resto de funciones nuevas que han ido adquiriendo estos péptidos. Es interesante observar que en mamíferos el principal órgano productor de IGF- I es el hígado [2], derivado del mismo primordio embrionario que el intestino, también principal productor de estos péptidos en C. *elegans,* el organismo mas primitivo que expresa estos péptidos. Pero también el protocerebro de éste y otros invertebrados produce factores insulínicos, lo que se ha mantenido hasta los mamíferos [3].

Durante el desarrollo cerebral es incuestionable un papel fundamental del IGF-I para que se produzca una formación adecuada de distintas estructuras, particularmente el hipocampo, actuando como un coordinador de distintas poblaciones celulares ya que modula gran parte de los tipos celulares que componen el tejido cerebral. Este hecho ha sido elegantemente documentado a través de manipulación genética fundamentalmente por el laboratorio de J DÉrcole [4]. Eliminando o sobreexpresando a lo largo del desarrollo bien el IGF-I o su receptor mediante el sistema Cre/Lox en distintos tipos celulares del cerebro este

laboratorio ha mostrado que este factor trófico es determinante para que se produzca una oligodendrogenesis normal, crecimiento y diferenciación de neuronas e incluso cuando el receptor está ausente, para que el organismo sea viable [5]. Aunque este último efecto tan drástico no ha sido corroborado por otros autores eliminando el receptor de IGF-I neuronal mediante la misma estrategia: usando el promotor de nestina para dirigir la expresión de Cre, igualmente se producían alteraciones fenotípicas muy importantes [6]. Pero como el cerebro adulto fabrica muy pequeñas cantidades de IGF-I se ha considerado poco relevante para la fisiología cerebral. Hasta hace poco. En la actualidad se considera al IGF-I, independientemente de su procedencia, como un prototipo de factor neuroprotector [7].

ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DEL SISTEMA IGF-I EN EL CEREBRO ADULTO

Durante el desarrollo prácticamente todo el cerebro produce IGF-I y todos los tipos celulares (neuronas, glia, endotelio…etc) expresan su receptor [8-10]. Además, la mayoría de las proteínas transportadoras de IGFs, las llamadas IGFBPs, también se expresan abundantemente en esta etapa [9]. Junto con el IGF-II y su receptor [11], muchos de los componentes del sistema IGF se expresan desde etapas tempranas del desarrollo cerebral. En el adulto la principal diferencia es que los niveles de expresión del péptido se reducen mucho (básicamente se expresa en hipocampo, cerebelo, corteza y médula espinal, pero a niveles muy bajos), mientras que los niveles de receptor mas o menos se mantienen constantes a lo largo de todas las areas cerebrales y las IGFBPs tienden a presentar localizaciones mas específicas [12-16]. Como las IGFBPs muestran funciones por una parte aparentemente redundantes y por otra específicas, el significado funcional de su distribución anatómica por el cerebro permanece sin resolver. Este hecho es un buen ejemplo de nuestra limitada comprensión de este complejo sistema trófico cerebral. Quizás algunas observaciones de la patología puedan ayudarnos a entenderlo mejor. Por ejemplo, se han encontrado en ratones *weaver* atáxicos niveles altos de IGFBP-5 en el cerebelo, un area donde esta proteína transportadora es particularmente abundante. Se ha postulado que este exceso pueda estar detrás de la resistencia a IGF-I en estos ratones [17]. También se ha observado niveles elevados de IGFBP-2 en la médula espinal de enfermos con esclerosis lateral amiotrófica y por ello se ha propuesto también un estado de resistencia a IGF-I en estos pacientes [18]. Mediante ablación genética de las distintas IGFBPs también podemos inferir que cada una

de ellas desarrolla funciones específicas [19], pero se necesitan mas estudios para tener un conocimiento mas claro de su papel.

Una característica particular del sistema trófico IGF cerebral es que los niveles mas altos de receptores y proteínas transportadoras se encuentran en las células endoteliales y epiteliales que forman las barreras hemato-encefálicas a nivel de los vasos y del plexo coroideo, respectivamente [20,21]. Los niveles cerebrales de IGF-I se mantienen relativamente constantes a lo largo de la vida adulta (aunque declinan con la edad, como en el resto del organismo, [22]), a pesar de que los niveles de ARNm de IGF-I en cerebro son muy bajos. Estas aparentes discrepancias ponen de manifiesto un mecanismo que en la actualidad ya está firmemente demostrado: el IGF-I sérico accede al cerebro a través de las barreras hemato-encefálicas [23]. No deja de ser intrigante esta organización funcional para un factor trófico como el IGF-I que se produce en grandes cantidades durante el desarrollo cerebral y que, aunque en pequeñas cantidades, se sigue fabricando en el cerebro adulto. ¿No seria mas eficiente el que se mantuvieran los niveles de producción de IGF-I a nivel local en vez de tenerlo que importar de la periferia? La única explicación lógica de esta organización aparentemente tan costosa es que el IGF-I sérico y el producido localmente deben de cumplir funciones distintas. El problema es que no lo sabemos.

En principio se podría aclarar la diferencia entre IGF-I cerebral e IGF-I periférico mediante manipulación genética. Como la eliminación completa del gen IGF-I produce una mortandad perinatal muy elevada y los pocos animales supervivientes apenas llegan a la edad adulta [24], se ha recurrido a la eliminación del IGF-I o de su receptor en tipos celulares específicos mediante el clásico uso de promotores específicos y el sistema Cre/Lox. Un tanto sorprendentemente se vio que la eliminación de una parte importante del IGF-I circulante (entre el 60-70%) tras eliminar el gen IGF-I hepático no producía alteraciones en el crecimiento somático [2], es decir que el IGF-I hormonal no es importante para el crecimiento a pesar de que esté regulado directamente por la hormona de crecimiento. Sin embargo, si sobre un fondo genético nulo para IGF-I se "inserta" el gen a nivel hepático el fenotipo letal característico de la ausencia total de IGF-I se rescata prácticamente por completo [25]. Quizás aún mas sorprendente es que la eliminación parcial del IGF-I a nivel del músculo y del hueso si genera una marcada letalidad perinatal [26]. Para el caso del IGF-I cerebral, su eliminación parcial usando el promotor de la CamKII específico para interneuronas telencefálicas postnatales no produjo un cambio fenotípico reseñable [27] teniendo los animales transgénicos un aspecto normal. Por el contrario, los animales deficitarios en IGF-I sérico (tras la eliminación del gen he-

pático) si tenían un marcado fenotipo cerebral [28,29]. Estos animales presentan alteraciones en la neurogénesis hipocampal, respuestas alteradas a ejercicio físico, deterioro cognitivo y hasta amiloidosis [30]. Estas observaciones refuerzan un papel muy importante para el IGF-I sérico a nivel cerebral y dejan sin responder el significado funcional del IGF-I sintetizado a nivel cerebral. ¿Es quizás un sistema local que responde sólo a alteraciones homeostásicas? Desde luego en cualquier situación de daño tisular el cerebro genera una respuesta trófica muy amplia, en la que se incluye el IGF-I [31].

PAPEL DEL IGF-I EN EL CEREBRO ADULTO: FUNCIONES GENERALES Y FUNCIONES ESPECÍFICAS

La enorme pleiotropía de este factor de crecimiento hace que el conocimiento de sus funciones cerebrales sea un auténtico desafío. No sólo muestra un abanico de actividades biológicas muy dispares sino que además afecta a todos los tipos celulares del tejido nervioso (neuronas, glia, endotelio, epitelio...etc) y, como se está observando mas recientemente, de forma dependiente del contexto celular. Es decir, no es lo mismo que la célula diana del IGF-I se esté dividiendo o que se encuentre en alguna fase de diferenciación, por ejemplo. Podríamos comenzar diciendo que dentro del cerebro el IGF-I realiza una serie de funciones que pueden considerarse de tipo general para todos los tejidos. Así, fundamentalmente el IGF-I es un "remodelador" de tejidos. Es decir, este factor trófico puede modificar la composición celular de un tejido dado en función de las cambiantes necesidades funcionales. En general estas son respuestas de tipo adaptativo y por lo tanto netamente homeostásicas, aunque no podemos descartar que algunas de sus funciones remodeladoras, en condiciones de ruptura de la homeostasis resulten maladaptativas. Un ejemplo sería su posible papel en el favorecimiento del crecimiento tumoral por sus características de potente agente anti-apoptótico [32].

En el cerebro, el IGF-I mantiene el árbol vascular en función de la demanda funcional [33] asi como controla la neurogénesis adulta de forma tónica [28]. Aparentemente otro componente importante de la arquitectura cerebral como es la mielina también estaría regulado por este factor trófico [34]. Respecto a otros tipos celulares no sabemos con certeza el papel que pueda jugar el IGF-I en condiciones normales, aunque todo hace pensar que ejerza también un efecto regulador homeostásico sobre el tamaño poblacional. Desde luego en etapas de desarrollo este es un papel importante del IGF-I [35]. En definitiva, el IGF-I es un remodelador del tejido nervioso a través de sus acciones anti-apoptóticas y mi-

togénicas, asi como diferenciadoras, aspectos clásicos de las acciones de los factores tróficos. Además, en el cerebro juega un papel en el metabolismo celular ya que participa en el control de disponibilidad de nutrientes y oxígeno [33,36]. Este mismo papel lo ejerce también en el resto del organismo [37], siendo un péptido eminentemente anabólico. Estas características tróficas de índole genérico hacen del IGF-I un modulador central del estado funcional del cerebro.

TABLA 1. *Canales iónicos modulados por IGF-I en neuronas*

Canal	Efecto del IGF-I	Referencia
K^+	Inhibe corrientes I_A	[62]
Cl^+	Activa el co-transportador de K/Cl	[63]
Ca^{++}	Activa canales N y L	[64]
	Transloca canales tipo GRC a la membrana plasmática[a]	[65]
	Transloca canales dependientes de voltaje a la membrana plasmática[a]	[66]
AMPA	Transloca el receptor al citosol[b]	[50]
Kainato	Estimula al receptor	[49]

[a] Se activa el canal.
[b] Se genera una disminución de receptores.

El IGF-I ejerce además varias funciones específicas dentro del tejido nervioso. Una de ellas, con amplias consecuencias funcionales, es su capacidad de modular multitud de canales iónicos presentes en neuronas (Tabla 1), varios de ellos asociados a receptores de neurotransmisores [38]. Evidentemente una de estas consecuencias es que puede afectar la excitabilidad neuronal y por lo tanto la eficacia de todo un circuito. Otra característica, que probablemente aúna efectos inmediatos y crónicos (tróficos) del IGF-I es a nivel de neurotransmisión, en concreto glutamatérgica [39]. Esta capacidad le permite incidir en procesos cognitivos [29,40]. Que un factor sérico tenga efectos pro-cognitivos es muy intrigante, pero permite explicar la conocida relación directa entre niveles circulantes de IGF-I y función cognitiva en la población humana normal. Cuanto mas elevados, mejor se mantiene esta capacidad [41].

Finalmente, un papel muy relevante del IGF-I es mantener los niveles de péptidos amiloides (Aβ), cerebrales [42]. Este papel parece ejercerlo a nivel de

sistema. Es decir, el IGF-I actúa en muchos, sino todos, los procesos implicados en la regulación de los niveles de Aβ en el cerebro. Así, modula los sistemas de degradación de Aβ [43], las rutas de síntesis (anti- y pro-amiloidogénicas) y los sistemas de aclaramiento [44-46]. Y esto parece hacerlo no solo sobre las neuronas sino también a nivel de los vasos sanguíneos, epitelio de los plexos coroideos y muy probablemente sobre la glia. Desconocemos si el IGF-I realiza este tipo de acción global sobre otros órganos así que podemos considerar, al menos de momento, que este efecto a nivel de sistema es exclusivo al cerebro. Esta faceta del IGF-I, en general poco reconocida de momento, nos permite vislumbrar el papel de este péptido a nivel cerebral desde una perspectiva mas global. Quizás algo similar ocurra sobre neurotransmisión glutamatérgica ya que hasta donde sabemos, el IGF-I regula los niveles de expresión de distintos receptores de glutamato [39,47,48] y además regula la eficacia de diversos receptores glutamatérgicos de forma aguda [49-51]. Asimismo podemos predecir que el IGF-I debe de ser un determinante crucial de la plasticidad sináptica ya que regula muchos canales iónicos de forma rápida. No sabemos aún si ejerce estos efectos moduladores también regulando los niveles de estos canales mediante efectos tróficos a largo plazo.

HACIA UNA NEUROBIOLOGÍA DEL IGF-I.

Precisamente por la gran variedad de acciones que realiza el IGF-I sobre el cerebro es difícil determinar el significado funcional global de este péptido. No es suficiente decir que dado que ejerce una gran variedad de acciones debe ser muy importante. Necesitamos poder alcanzar un conocimiento mas preciso de la neurobiología de este factor trófico. Quedan muchos temas pendientes para llegar a este punto. A continuación mencionaremos los que parecen mas relevantes en la actualidad.

1. *El IGF-I circulante como factor neurotrófico*. A pesar de que existe abundante literatura sobre el papel neuroactivo del IGF-I presente en suero y de procedencia fundamentalmente hepática [2], aún no entendemos el significado biológico de esta organización funcional tan compleja ni los mecanismos que regulan la interacción entre el IGF-I circulante y el producido localmente en el cerebro. Parece que el cerebro es capaz de distinguir entre el IGF-I sérico y el producido localmente ya que la falta del primero produce graves consecuencias funcionales mientras que la carencia del producido en el cerebro no parece tener grandes consecuencias [27]. Es evidente por tanto que las señales de IGF-I están compartimentalizadas a nivel cerebral, es decir que el

sistema nervioso distingue y utiliza de distinta forma el IGF-I sérico del producido localmente. Este tipo de organización es común en el cerebro; las neuronas distinguen perfectamente el origen de un determinado neurotransmisor aunque éste se encuentre accesible por muchos sitios posibles. Es imprescindible que entendamos por qué mecanismos el cerebro determina el origen del IGF-I pero ya tenemos alguna evidencia que indica que se produce una regulación relativamente rápida de los niveles de IGF-I cerebral en función de la entrada del de procedencia sistémica. Si experimentalmente elevamos la entrada de IGF-I al cerebro desde la periferia, los niveles de ARN mensajero cerebral de este péptido disminuyen (observaciones sin publicar). Parece que en condiciones fisiológicas esta adaptación también se produce ya que la estimulación que produce el ejercicio físico en la entrada al cerebro del IGF-I sérico [23] genera también esta respuesta adaptativa (observaciones sin publicar). Muy probablemente este equilibrio entre periferia y cerebro sea importante en determinadas situaciones patológicas. Tenemos evidencias de que en animales con amiloidosis tipo Alzheimer puede que este balance esté alterado. Evidentemente esta faceta del IGF-I no plantea mas que nuevas interrogantes que están pendientes de resolverse.

2. *Significado funcional de receptores híbridos insulina/IGF-I*. El receptor de insulina y el de IGF-I comparten una homología estructural tan estrecha que les permite formar híbridos funcionalmente activos y presentes en muchos tipos celulares [52]. Aún no se entiende el significado biológico de estos receptores mixtos, aunque hay evidencias experimentales de que pueden tener un significado en distintas patologías, incluso en algunas tan importantes como la diabetes [53]. En algunas circunstancias se ha visto que la presencia de receptores híbridos significa una actividad exclusiva para el IGF-I a pesar de que la insulina en principio puede unirse a estos receptores [54]. Es decir, parecen responder únicamente a concentraciones fisiológicas de IGF-I. En el cerebro, el hecho de que muchas neuronas expresen ambos tipos de receptores hace pensar que existan de forma habitual. En las células amacrinas de la retina ya se han demostrado. Postulamos que estos receptores híbridos pueden ser fundamentales para una interacción funcional entre el IGF-I y la insulina, pero es necesario mas trabajo para confirmar esta posibilidad.

3. *Interacciones con insulina e IGF-II*. Que existen interacciones entre los distintos miembros de la familia no se debe sólo a la promiscuidad relativa de sus receptores (el receptor IGF-I reconoce a los tres ligandos, por ejemplo). Está bien documentado a nivel periférico que los niveles circulantes de IGF-I son un

determinante muy importante de la sensibilidad a insulina [55], aunque los mecanismos implicados no se conozcan. Es mas que probable que este efecto controlador del IGF-I sérico sobre la sensibilidad a insulina se ejerza a nivel central [56]. Parece también que existe una interacción funcional muy importante entre IGF-I e IGF-II, no solo porque el receptor de IGF-II pudiera actuar como una especie de aclarador de ambos péptidos sino porque el IGF-I influye sobre la sensibilidad del receptor IGF-II y a su vez éste último parece un importante determinante de la función del receptor IGF-I en procesos patológicos tales como cáncer. Postulamos también un posible papel del IGF-II en la biodisponibilidad de IGFBPs, ya que éstas juegan papeles fisiológicos independientes de sus acciones como transportadoras de IGFs. De este modo el IGF-II afectaría también la biodisponibilidad del IGF-I. Queda por establecer la existencia de interacciones funcionales entre estos tres péptidos a nivel cerebral, pero es evidente que existen y que tienen que ser muy relevantes no sólo en la fisiología normal de estos factores tróficos sino tambien, y de forma muy relevante, en situaciones de alteración homeostásica.

4. *Papel del IGF-I en patologías cerebrales*. Las situaciones patológicas ofrecen una oportunidad de entender la fisiología normal a manera de "experimentos naturales" donde las funciones normales se alteran. Una observación muy significativa es que la mayor parte de las patologías que afectan al tejido nervioso cursan con alteraciones en el sistema IGF [7]. Esto quizás no sea mas que un reflejo de la enfermedad en sí ya que una enorme cantidad de enfermedades alteran los niveles del sistema IGF en sangre. Pero lo significativo es que las alteraciones se produzcan no sólo a nivel cerebral sino a nivel sistémico, reforzando la idea de que el IGF-I circulante tiene que tener un papel neuroactivo relevante.

En general estas alteraciones significan una disminución de niveles de IGF-I y modificaciones diversas de las IGFBPs, es decir un estado de deficiencia funcional. En algunas enfermedades, o en algunos estadios de ciertas enfermedades (demencia de Alzheimer) se producen alteraciones cambiantes en los niveles séricos del sistema [57-60]. Incluso en otras se produce un aumento, que interpretamos como una respuesta compensatoria ante una situación que requiera mayor actividad neuroprotectora. Probablemente el sistema IGF está disminuído de forma secundaria a la patología en la mayor parte de los casos, aunque en algunos casos estas alteraciones pudieran contribuir de forma primaria a la enfermedad. De cualquier forma el corregir estas modificaciones debe de ser terapéuticamente útil, como numerosos estudios pre-clinicos y clínicos han mostrado ya [45,61].

BIBLIOGRAFÍA

(1) Mc Rory, J.E. and Sherwood, N.M. (1997). Ancient divergence of insulin and insulin-like growth factor. *DNA Cell Biol. 16*: 939-949.

(2) Yakar, S., Liu, J.L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., and LeRoith, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96: 7324-7329.

(3) Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 11: 213-221.

(4) D'Ercole, A.J., Ye, P., Calikoglu, A.S., and Gutierrez-Ospina, G. (1996). The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 13: 227-255.

(5) Liu, W., Ye, P., O'Kusky, J.R., and D'Ercole, A.J. (2009). Type 1 insulin-like growth factor receptor signaling is essential for the development of the hippocampal formation and dentate gyrus. *J. Neurosci Res.*

(6) Kappeler, L., De Magalhaes Filho, C.M., Dupont, J., Leneuve, P., Cervera, P., Perin, L., Loudes, C., Blaise, A., Klein, R., Epelbaum, J. *et al.* (2008). Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS. Biol.* 6: e254.

(7) Torres, A., I (2005). Role of insulin-like growth factors in neuronal plasticity and neuroprotection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 567: 243-258.

(8) Bondy, C.A. (1991). Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J. Neurosci.* 11: 3442-3455.

(9) Bondy, C.A. and Lee, W.H. (1993). Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 692: 33-43.

(10) Bach, M.A., Shen-Orr, Z., Lowe, W.L., Jr., Roberts, C.T., Jr., and LeRoith, D. (1991). Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 10: 43-48.

(11) Hawkes, C. and Kar, S. (2004). The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 44: 117-140.

(12) Albiston, A.L. and Herington, A.C. (1992). Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid

(mRNA) in the rat: comparison with IGF-I mRNA expression. *Endocrinology* 130: 497-502.

(13) Naeve, G.S., Vana, A.M., Eggold, J.R., Verge, G., Ling, N., and Foster, A.C. (2000). Expression of rat insulin-like growth factor binding protein-6 in the brain, spinal cord, and sensory ganglia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 75: 185-197.

(14) Gonda, Y., Sakurai, H., Hirata, Y., Tabata, H., Ajioka, I., and Nakajima, K. (2007). Expression profiles of Insulin-like growth factor binding protein-like 1 in the developing mouse forebrain. *Gene Expr. Patterns.* 7: 431-440.

(15) Ocrant, I., Fay, C.T., and Parmelee, J.T. (1990). Characterization of insulin-like growth factor binding proteins produced in the rat central nervous system. *Endocrinology* 127: 1260-1267.

(16) Stenvers, K.L., Zimmermann, E.M., Gallagher, M., and Lund, P.K. (1994). Expression of insulin-like growth factor binding protein -4 and -5 mRNAs in adult rat forebrain. *J. Comp. Neurol.* 339: 91-105.

(17) Lee, W.H., Wang, G.M., Lo, T., Triarhou, L.C., and Ghetti, B. (1995). Altered IGFBP5 gene expression in the cerebellar external germinal layer of weaver mutant mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30: 259-268.

(18) Wilczak, N., de Vos, R.A., and De Keyser, J. (2003). Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 361: 1007-1011.

(19) Wood, A.W., Schlueter, P.J., and Duan, C. (2004). Targeted knockdown of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) disrupts cardiovascular development in zebrafish embryos. *Mol. Endocrinol.*

(20) Ayer-le Lievre, C., Stahlbom, P.A., and Sara, V.R. (1991). Expression of IGF-I and -II mRNA in the brain and craniofacial region of the rat fetus. *Development* 111: 105-115.

(21) Davidson, D.A., Bohannon, N.J., Corp, E.S., Lattemann, D.P., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Dorsa, D.M., and Baskin, D.G. (1990). Evidence for separate receptors for insulin and insulin-like growth factor-I in choroid plexus of rat brain by quantitative autoradiography. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 1289-1294.

(22) Sonntag, W.E., Lynch, C.D., Bennett, S.A., Khan, A.S., Thornton, P.L., Cooney, P.T., Ingram, R.L., McShane, T., and Brunso-Bechtold, J.K. (1999). Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats. *Neuroscience* 88: 269-279.

(23) Carro, E., Nunez, A., Busiguina, S., and Torres-Aleman, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J. Neurosci.* 20: 2926-2933.

(24) Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. Cell 75: 73-82.

(25) Wu, Y., Sun, H., Yakar, S., and LeRoith, D. (2009). Elevated levels of IGF-1 in serum rescue the severe growth retardation of IGF-1 null mice. *Endocrinology* en.

(26) Govoni, K.E., Wergedal, J.E., Florin, L., Angel, P., Baylink, D.J., and Mohan, S. (2007). Conditional deletion of insulin-like growth factor-I in collagen type 1alpha2-expressing cells results in postnatal lethality and a dramatic reduction in bone accretion. *Endocrinology* 148: 5706-5715.

(27) Davila, D., Piriz, J., Trejo, J.L., Nunez, A., and Torres-Aleman, I. (2007). Insulin and insulin-like growth factor I signalling in neurons. *Front Biosci.* 12: 3194-3202.

(28) Trejo, J.L., Llorens-Martin, M.V., and Torres-Aleman, I. (2008). The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol. Cell Neurosci* 37: 402-411.

(29) Trejo, J., Piriz, J., Llorens-Martin, M.V., Fernandez, A.M., Bolos, M., LeRoith, D., Nunez, A., and Torres-Aleman, I. (2007). Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol. Psychiatry* 12: 1118-1128.

(30) Trejo, J.L., Carro, E., Garcia-Galloway, E., and Torres-Aleman, I. (2004). Role of insulin-like growth factor I signaling in neurodegenerative diseases. *J. Mol. Med.* 82: 156-162.

(31) Isackson, P.J. (1995). Trophic factor response to neuronal stimuli or injury. Curr. Opin. Neurobiol. 5: 350-357.

(32) Kurmasheva, R.T. and Houghton, P.J. (2006). IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1766: 1-22.

(33) Lopez-Lopez, C., LeRoith, D., and Torres-Aleman, I. (2004). Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101: 9833-9838.

(34) McMorris, F.A., Mozell, R.L., Carson, M.J., Shinar, Y., Meyer, R.D., and Marchetti, N. (1993). Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 692: 321-334.

(35) Torres-Aleman, I., Villalba, M., and Nieto-Bona, M.P. (1998). Insulin-like growth factor-I modulation of cerebellar cell populations is developmentally stage-dependent and mediated by specific intracellular pathways. Neuroscience 83: 321-334.

(36) Bondy, C.A. and Cheng, C.M. (2002). Insulin-like growth factor-1 promotes neuronal glucose utilization during brain development and repair processes. *Int. Rev. Neurobiol.* 51: 189-217.

(37) Clemmons, D.R. (2004). Role of insulin-like growth factor iin maintaining normal glucose homeostasis. *Horm. Res. 62 Suppl.* 1: 77-82.

(38) Torres-Aleman, I. (1999). Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain. *Horm. Metab Res.* 31: 114-119.

(39) Castro-Alamancos, M.A. and Torres-Aleman, I. (1993). Long-term depression of glutamate-induced gamma-aminobutyric acid release in cerebellum by insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90: 7386-7390.

(40) Castro-Alamancos, M.A. and Torres-Aleman, I. (1994). Learning of the conditioned eye-blink response is impaired by an antisense insulin-like growth factor I oligonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91: 10203-10207.

(41) Aleman, A., Verhaar, H.J., de Haan, E.H., de Vries, W.R., Samson, M.M., Drent, M.L., van der Veen, E.A., and Koppeschaar, H.P. (1999). Insulin-like growth factor-I and cognitive function in healthy older men. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 84: 471-475.

(42) Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., and Torres-Aleman, I. (2002). Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat. Med.* 8: 1390-1397.

(43) Zhao, W.Q., Lacor, P.N., Chen, H., Lambert, M.P., Quon, M.J., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (2009). Insulin Receptor Dysfunction Impairs Cellular Clearance of Neurotoxic Oligomeric A{beta}. *J. Biol. Chem.* 284: 18742-18753.

(44) Adlerz, L., Holback, S., Multhaup, G., and Iverfeldt, K. (2007). IGF-1-induced processing of the amyloid precursor protein family is mediated by different signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 282: 10203-10209.

(46) Shineman, D., Daina, A., Kim, M., and Lee, V. (2009). Constitutively active Akt inhibits trafficking of APP and APP metabolites through feedback inhibition of PI3K. *Biochemistry.*

(47) Calissano, P., Ciotti, M.T., Battistini, L., Zona, C., Angelini, A., Merlo, D., and Mercanti, D. (1993). Recombinant human insulin-like growth factor I exerts a tro-

phic action and confers glutamate sensitivity on glutamate-resistant cerebellar granule cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90: 8752-8756.

(48) Suzuki, K., Ikegaya, Y., Matsuura, S., Kanai, Y., Endou, H., and Matsuki, N. (2001). Transient upregulation of the glial glutamate transporter GLAST in response to fibroblast growth factor, insulin-like growth factor and epidermal growth factor in cultured astrocytes. *J. Cell Sci.* 114: 3717-3725.

(49) Gonzalez, d.l., V, Buno, W., Pons, S., Garcia-Calderat, M.S., Garcia-Galloway, E., and Torres-Aleman, I. (2001). Insulin-like growth factor I potentiates kainate receptors through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. *Neuroreport* 12: 1293-1296.

(50) Man, Y.H., Lin, J.W., Ju, W.H., Ahmadian, G., Liu, L., Becker, L.E., Sheng, M., and Wang, Y.T. (2000). Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin- dependent receptor internalization. *Neuron* 25: 649-662.

(51) Wang, Y.T. and Linden, D.J. (2000). Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron* 25: 635-647.

(52) Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev.* 30: 586-623.

(53) Fernandez, A.M., Kim, J.K., Yakar, S., Dupont, J., Hernandez-Sanchez, C., Castle, A.L., Filmore, J., Shulman, G.I., and Le, R.D. (2001). Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev.* 15: 1926-1934.

(54) Hunter, R. and Hers, I. (2009). Insulin/IGF-1 hybrid receptor expression on human platelets; consequences for the effect of insulin on platelet function. *J. Thromb. Haemost.*

(55) Sandhu, M.S., Heald, A.H., Gibson, J.M., Cruickshank, J.K., Dunger, D.B., and Wareham, N.J. (2002). Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study. *Lancet* 359: 1740-1745.

(56) Foster, L.A., Ames, N.K., and Emery, R.S. (1991). Food intake and serum insulin responses to intraventricular infusions of insulin and IGF-I. *Physiol Behav.* 50: 745-749.

(57) Mustafa, A., Lannfelt, L., Lilius, L., Islam, A., Winblad, B., and Adem, A. (1999). Decreased plasma insulin-like growth factor-I level in familial Alzheimer's disease patients carrying the Swedish APP 670/671 mutation. *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* 10: 446-451.

(58) Salehi, Z., Mashayekhi, F., and Naji, M. (2008). Insulin like growth factor-1 and insulin like growth factor binding proteins in the cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's disease. *Biofactors* 33: 99-106.

(59) Tham, A., Nordberg, A., Grissom, F.E., Carlsson-Skwirut, C., Viitanen, M., and Sara, V.R. (1993). Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with dementia of the Alzheimer type. *J. Neural Transm. Park Dis. Dement.* Sect. 5: 165-176.

(60) Watanabe, T., Miyazaki, A., Katagiri, T., Yamamoto, H., Idei, T., and Iguchi, T. (2005). Relationship between serum insulin-like growth factor-1 levels and Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Am. Geriatr. Soc.* 53: 1748-1753.

(61) Carro, E., Trejo, J.L., Gerber, A., Loetscher, H., Torrado, J., Metzger, F., and Torres-Aleman, I. (2006). Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol. Aging* 27: 1250-1257.

(62) Nunez, A., Carro, E., and Torres-Aleman, I. (2003). Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *J. Neurophysiol.* 89: 3008-3017.

(63) Kelsch, W., Hormuzdi, S., Straube, E., Lewen, A., Monyer, H., and Misgeld, U. (2001). Insulin-like growth factor 1 and a cytosolic tyrosine kinase activate chloride outward transport during maturation of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 21: 8339-8347.

(64) Blair, L.A. and Marshall, J. (1997). IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase-dependent manner. *Neuron* 19: 421-429.

(65) Kanzaki, M., Zhang, Y.Q., Mashima, H., Li, L., Shibata, H., and Kojima, I. (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin- like growth factor-I. *Nat. Cell Biol.* 1: 165-170.

(66) Viard, P., Butcher, A.J., Halet, G., Davies, A., Nurnberg, B., Heblich, F., and Dolphin, A.C. (2004). PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat. Neurosci.* 7: 939-946.

8. Papel de la glucoquinasa como sensor cerebral de glucosa y su contribución en el control de la ingesta de alimentos

ENRIQUE BLÁZQUEZ FERNÁNDEZ

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense y Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico San Carlos-Pab. 8, Madrid.

RESUMEN

La glucosa es utilizada por las células fundamentalmente como un substrato energético, pero también como una molécula de señalización implicada en procesos de gran importancia funcional, tales como los sistemas sensores. La isoforma del transportador de glucosa GLUT-2 y especialmente la glucoquinasa (GK)han sido considerados como componentes de un sistema sensor de glucosa, que controla varios procesos claves como la secreción de insulina dependiente de glucosa y la estimulación de la captación de glucosa por el hígado y músculo esquelético. De la misma forma este sistema podría modular la conducta alimentaria, y la liberación de las hormonas contrareguladoras en respuesta a estados de hipoglucemia. Nuestros resultados indican que los ARN mensajeros y proteínas de GLUT-2 y GK se coexpresan principalmente en células del hipotálamo de humanos y animales de experimentación, en áreas responsables del control de la ingesta de alimentos. También hemos encontrado una actividad fosforilante de la glucosa con una alta Km y con propiedades cinéticas semejantes a las descritas previamente en hígado, y que no es inhibida por glucosa-6-fosfato. La actividad de la GK puede también ser regulada por una proteína reguladora de GK (GKRP), la cual he-

mos identificado en cerebro en las mismas áreas que la GK. La coexpresión de GLUT-2, GK y GKRP en áreas implicadas en el control de la ingesta, podrían jugar un papel como sensores de glucosa, en los que GLUT-2 puede tener un papel permisivo y las interacciones de GK con GKRP desempeñar una auténtica actividad sensora de glucosa. Además el papel de los péptidos anorexígenos y orexígenos a través de sus receptores en este sistema podrían facilitar la transducción de señales requeridas para producir un estado de saciedad. De hecho en este artículo presentamos evidencias experimentales de que el GLP-1, un péptido anorexígeno, controla el metabolismo de glucosa en el hipotálamo de humanos dentro de un área implicada en la regulación de la conducta alimentaria.

ABSTRACT

Glucose is used mainly as an energy substrate but also as a signaling molecule implied in processes of primary functional concern, such as glucose sensing. Glucose transport isoform GLUT-2 and especially glucokinase (GK) have been considered as components of a glucose sensor system controlling several key processes such as, glucose-dependent insulin secretion, and stimulation of glucose uptake by liver and skeletal muscle. In the same way this system might modulate feeding behavior and the release of counteregulatory hormones that defend against hypoglycaemia. Our findings indicate that GLUT-2 and GK mRNAs and proteins are coexpressed mainly in the hypothalamus of human and experimental animals, in areas implied in the control of food intake. Also, a high Km glucose phosphorylating activity with kinetic properties similar to that reported previously in liver was observed, with a high apparent Km for glucose that displays no product inhibition by glucose-6-phosphate. GK activity may be also regulated by the presence of glucokinase regulatory protein (GKRP), which we have found in the brain of human and experimental animals, in the same areas than GK. Coexpression of GLUT-2, GK and GKRP in areas implied in feeding behaviour might play a role in glucose sensing, in which GLUT-2 has a permissive role and the interactions of GK with GKRP made possible a real sensor activity. Furthermore the effects of anorexigenic and orexigenic peptides through its receptors in this system, should facilitate the transduction of signals required to produce a state of satiety. In fact here we present experimental evidences that GLP-1, an anorexigenic peptide, controls the glucose

metabolism in the human hypothalamus within of an area involved in the regulation of feeding behavior.

CONDUCTA ALIMENTARIA, CONTROL DEL PESO CORPORAL Y NEUROPÉPTIDOS

Por estudios realizados hace más de 60 años, con lesiones o estimulaciones en distintas áreas cerebrales, conocemos que el hipotálamo juega un papel fundamental en la regulación de la conducta alimentaria y de la homeostasis energética. Fundamentados en observaciones como la estimulación eléctrica del núcleo ventromedial hipotalámico (VMN) que suprimía la ingesta de alimentos y que las lesiones bilaterales de esta estructura producían hiperfagia y obesidad, el VMN fue denominado centro de la saciedad, mientras que las alteraciones inducidas en el área lateral hipotalámicas (LHA) producían respuestas opuestas a las anteriores y por ello fue llamada el centro del hambre. En estos procesos también están implicada la médula oblongata dorsomedial, que incluye el núcleo del tracto solitario (NTS) y el núcleo motor del vago (1,2). Estas áreas cerebrales usan nervios autónomos para modular la homeostasis de la glucosa en hígado y páncreas endocrino, produciendo en VMN y núcleo paraventricular (PVN) efectos inhibidores sobre la actividad del nervio vago y efectos excitatorios sobre la actividad del nervio esplácnico, mientras que LHA es excitadora para el nervio vago. Asimismo estas regiones se modifican por señales metabólicas, con cambios de la actividad eléctrica de las neuronas por la aplicación directa de glucosa o por alteraciones en las concentraciones circulantes de glucosa. En este sentido la glucosa es principalmente excitadora en VMN e inhibidora en LHA y NTS, y ambas respuestas sugieren la presencia de sensores de glucosa en dichas áreas del cerebro (2).

En las últimas décadas nuestro conocimiento sobre estos temas se ha enriquecido considerablemente, hasta el punto que actualmente sabemos de la existencia de subpoblaciones específicas de neuronas implicadas en la homeostasis energética, localizadas en los centros del hambre y la saciedad. Estas constituyen rutas neuronales que contienen péptidos orexígenos y anorexígenos, capaces de generar respuestas integradas a estímulos aferentes relacionados con modificaciones de metabolitos o de los depósitos de nutrientes.

Un grupo de hormonas peptídicas, que previamente se consideraron como componentes del sistema gastroenteropancreático y más tarde fuern identificadas en cerebro de mamíferos, tienen actividades moduladoras sobre el apetito,

procesos energéticos y peso corporal (3). Ellos participan junto con otros neuropéptidos como los opiáceos, galanina, neuropéptido Y, vasopresina y GHRH en el control de la conducta alimentaria, donde los efectos contrapuestos de los péptidos orexígenos y anorexígenos juegan un papel importante.

Se acepta que las células de varios núcleos hipotalámicas detectan señales de saciedad procedentes de la periferia que transmiten a otras áreas del cerebro. Los péptidos orexígenos y anorexígenos localizados en PNV,VMN,LHA y núcleo arqueado interaccionan unos con otros de forma que pueden inducir una conducta alimentaria característica. Así el péptido YY (3-36) es liberado postprandialmente desde el intestino (4) y actúa sobre los receptores NPY Y2 en el núcleo arqueado para inhibir la ingesta de alimentos con efecto a largo plazo, mientras que la grelina es secretada desde el estómago preprandialmente y actúa como un péptido orexígeno. Por otra parte péptidos de origen cerebral e intestinal como GLP-1, GLP-2 y CCK producen un efecto a corto plazo, mientras que insulina y leptina inhiben el apetito por aumento de la formación de POMC y disminución de la acción de NPY (5).

Los péptidos semejantes al glucagón 1 y 2 (6,7) modifican sensiblemente la conducta alimentaria. La administración intracerebroventricular o subcutánea produce una marcada reducción de la ingesta de alimentos y agua. La exendina-4, un potente agonista del GLP-1 (7-36) amida, tiene efectos más potentes que éste, que son bloqueados por las acciones antagonistas de la exendina (9-39). Estos hallazgos sugieren que el GLP-1 (7-36) amida puede modular la ingesta de alimentos y de líquidos a través de mecanismos centrales y periféricos. El GLP-1 (7-36) amida después de su administración subcutánea puede penetrar en cerebro mediante su unión a estructuras sin barrera hematoencefálica, como el organo subfornical y el área postrema (8) . Alternativamente el péptido podría ser internado en el cerebro a través del plexo coroideo, el cual tiene una gran concentración de receptores para GLP-1 (9).

La utilidad potencial de la administración periférica comparada con la central de los agonistas del receptor de GLP-1 sobre la conducta alimentaria ha sido estudiada en ratas obesas Zucker con resistencia a la acción de la insulina (10). Tanto la administración central o subcutánea de GLP-1 (7-36) amida o exendina-4 reducen la toma de alimentos, con un efecto más potente para el segundo agonista. Así la administración subcutánea crónica de exendina-4 no sólo disminuye la ingesta de alimentos sino que también reduce la ganancia de peso en las ratas obesas . Estas observaciones resaltan la utilidad de la exendina-4 como

agente para el tratamiento de la obesidad y/o diabetes. De hecho ambos agonistas del receptor de GLP-1 regulan la glucemia mediante la estimulación de la secreción de insulina dependiente de glucosa (11), la inhibición de la secreción de glucagón (12) y del vaciamiento gástrico (13), lo cual facilita el descenso de la glucemia en los diabéticos tipos 1 y 2 (14).

Por otra parte la administración intracerebroventricular de GLP-2 a roedores produce una reducción marcada de la ingesta de alimentos, pero no de la toma de agua. Sorprendentemente este efecto se puede evitar con la administración de exendina (9-39), un antagonista del receptor de GLP-1.

SISTEMAS SENSORES DE GLUCOSA

La homeostasis de la glucosa requiere de mecanismos hormonales y nerviosos para hacer frente al normal funcionamiento del cerebro y los tejidos periféricos. De esta forma la glucosa se necesita como un substrato energético, pero también como una molécula de señalización implicada en la secreción de insulina dependiente de glucosa, la estimulación del transporte y la utilización de glucosa por el músculo, así como modula la conducta alimentaria y la liberación de hormonas contrareguladoras ante situaciones de hipoglucemia. Por tanto los mecanismos glucoreguladores son fundamentales para proporcionar un suministro contínuo de glucosa al sistema nervioso central y para hacer frente a las necesidades metabólicas de los tejidos periféricos. Las concentraciones circulantes de glucosa se mantienen dentro de un rango fisiológico dependiendo del estado alimentario del individuo, los efectos antagonistas de las hormonas pancreáticas insulina y glucagón, las actividades del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal y los componentes del sistema nervioso autónomo. Alteraciones de los valores normoglucémicos tienen consecuencias deletéreas que aumentan la morbilidad y mortalidad de la población. Con objeto de evitar oscilaciones marcadas de la glucemia, los sensores de glucosa actúan en el intestino, células pancreáticas endocrinas, vena porta, sistema nerviosos central y algunas células neuroendocrinas, lo cual permite generar los mecanismos necesarios para mantener la homeostasis de la glucosa.

Los sensores de glucosa son diseños moleculares que determinan con precisión las concentraciones de glucosa en el espacio extracelular. La primera indicación sobre la existencia de un sistema sensor de glucosa fue descrito en las células pancreáticas beta (15), constituído por la isoforma del transportador de glucosa GLUT-2 y por la glucoquinasa (GK). Estas proteínas tienen una alta Km

para transportar o fosforilar glucosa respectivamente, lo cual permite que intervengan cuando aumenta la glucemia después de las comidas. Las células pancreáticas beta detectan las concentraciones de glucosa mediante los productos de su catabolismo, de forma que el grado del catabolismo de la glucosa debe ser proporcional a las concentraciones de glucosa en el espacio extracelular. La actividad del GLUT-2 juega un papel permisivo para el catabolismo de la glucosa, pero no es determinante como sensor de glucosa, ya que el transporte de glucosa en las células beta es 100 veces más alta que el grado de metabolización de la hexosa. En contraposición con ello, la GK cataliza el paso limitante del metabolismo de la glucosa actuando como un auténtico sensor de glucosa. La GK controla la oxidación de la glucosa y la formación de ATP, y como consecuencia de ello incrementa el cociente ATP/ADP que facilita el cierre de los canales de potasio y la despolarización de las células beta, lo cual promueve la apertura de los canales de calcio dependientes del aumento del voltaje celular. Estos cambios inducen una elevación del calcio intracelular responsable de la exocitosis de los gránulos de secreción de insulina.

Otro sistema sensor de glucosa está localizado en la vena porta cercano al hilio hepático y conectado a través de las ramas hepáticas del nervio vago a neuronas sensoras presentes en el hipotálamo lateral y el núcleo del tracto solitario (16). Este sensor de glucosa hepatoportal está constituído por GLUT-2 y los receptores de GLP-1 y somatostatina, los cuales requieren un gradiente de concentración de glucosa positivo para ser activado, y de esta manera controlar varias funciones como, la estimulación del transporte de glucosa hepático, la descarga del nervio vago, y el incremento de la utilización de la glucosa por el músculo esquelético.

Además la GK está presente en las células L y K intestinales productoras respectivamente de GLP-1 y GIP, y en las que puede jugar un papel sensor de glucosa, facilitador de la secreción de ambos péptidos en respuesta a la ingesta de alimentos, asegurando la actividad incretina de ambas moléculas dentro del eje entero-insular. Asimismo en la mucosa intestinal se han caracterizado sensores de glucosa que utilizan la GK como el auténtico detector de las concentraciones de la hexosa. Otros sistemas sensores de glucosa han sido descritos en cerebro, cuyas características e importancia se analizarán en el apartado siguiente.

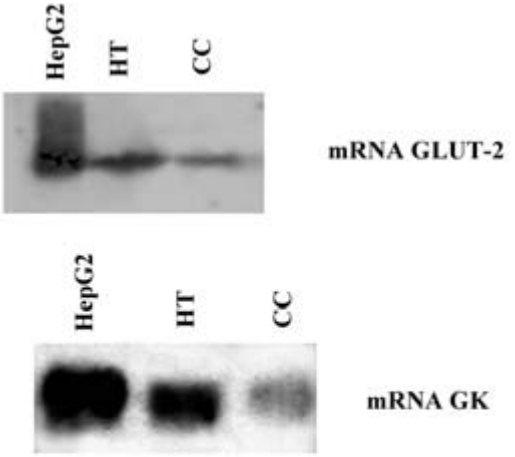
SENSORES DE GLUCOSA EN CEREBRO

Por los estudios realizados por nuestro grupo sabemos que los genes de GLUT-2, GK y de los receptores de GLP-1 se coexpresan en células

del hipotálamo de humanos y ratas, localizadas en áreas implicadas en la regulación de la homeostasis energética, ingesta de alimentos, metabolismo de la glucosa y del sistema nervioso autónomo (6, 9, 10, 17-19). La colocalización en estas células podría sugerir que intervienen en un sistema sensor de glucosa necesario para el establecimiento de un estado de saciedad.

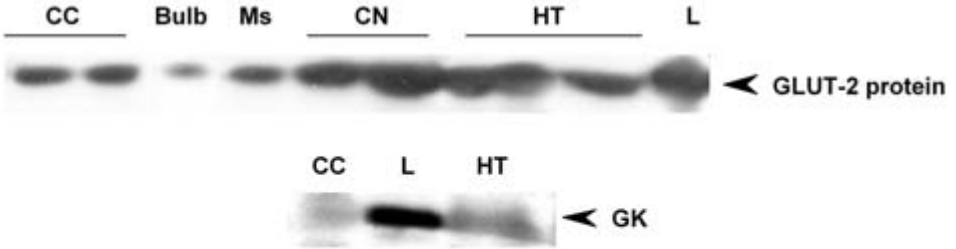
Al menos dos tipos de sensores de glucosa neuronales han sido descritos. Uno corresponde a las neuronas estimuladas (GE) por glucosa (20), presentes en el 40%del VMN del hipotálamo, que son excitadas por el aumento de glucosa en el espacio extracelular. Una conducta electrofisiológica similar ha sido observada en las células pancreáticas beta. Por el contrario el 30% de las neuronas inhibidas (GI) por la glucosa (21) en la LHA constituyen el segundo tipo, y al igual que las neuronas mientéricas o las células pancreáticas alfa son excitadas por la disminución de las concentraciones de glucosa en el espacio extracelular. Las similitudes entre neuronas sensoras y algunas células endocrinas son también evidentes por la presencia de canales de K^+_{ATP} que contribuyen a la despolarización de estas células. La activación de ellas por glucosa está basada en el hecho que los bloqueantes del transporte de glucosa o de la glucolisis impiden la actividad eléctrica inducida por la glucosa, mientras que otros nutrientes como el glicerol, gliceraldehido y lactato mimetizan los efectos de la glucosa (22). Ambos tipos de células sensoras de glucosa tienen GK al igual que receptores para moléculas orexígenas y anorexígenas, lo que las capacita para jugar un papel en el control de la ingesta de alimentos.

Cuando las neuronas GE son expuestas a elevadas concentraciones de glucosa, la activación de la GK produce un incremento del cociente ATP/ADP y como consecuencia de ello una inactivación del canal de $K^+_{ATP,}$ que da lugar a una despolarización de la membrana (23). Esto motiva la entrada de calcio a la célula mediada por una apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. A pesar de la amplia distribución en cerebro de los canales de potasio, tan sólo áreas selectivas de este organo muestran propiedades sensoras de glucosa, lo cual parece estar condicionado por la actividad de la GK. Esta enzima está presente en las células GE, donde la elevación de la glucosa estimula la expresión de c-fos, y también en las GI donde la hipoglucemia también induce la expresión de c-fos (24). En la misma dirección cuando las concentraciones de glucosa disminuyen, los niveles de calcio aumentan en las neuronas GI, pero aparecen reducidos en las células GE. El uso de inhibidores de la GK sugieren



HepG2: Línea celular HepG2
HT: Hipotálamo.
CC: Corteza cerebral.

FIGURA 1. *Expresión del ARN mensajero de GLUT-2 y GK en cerebro humano.*



CC: Corteza Cerebral. **Bulb: Bulbo.** **Ms: Mesencefalo**
CN: Núcleo Caudado. **HT: Hipotalamo.** **L: Hígado de rata**

FIGURA 2. *Detección por inmunotransferencia de las proteinas GLUT-2 y glucoquinasa (GK) en diferentes regiones de cerebro humano e hígado de rata.*

que las neuronas GE podrían ser inactivadas por un descenso del cociente ATP/ADP y activación del canal de potasio, mientras que las células GI podrían ser activadas por un descenso de la concentración de glucosa en un proceso mediado por un canal de potasio, una bomba sodio-potasio dependiente de ATP, o por una canal de cloruro. Estas sugerencias están apoyadas por las observa-

TABLA 1. *Actividades fosforilantes de glucosa en cerebro e hígado.*

Tejido estudiado	Actividad fosforilante total de glucosa (pmol [14C]-Glc6P/min x µg protein)		Actividad hexoquinasa de baja Km (%)	Actividad glucoquinasa (%)
Hígado	0.51-3.60	(10)	16.1 ± 1.4	83.9 ± 1.4
Hipotálamo	6.7-13.4	(12)	59.6 ± 0.85	40.4 ± 0.85
Corteza cerebral	5.8-14.9	(8)	59.3 ± 1.1	40.7 ± 1.1
Tálamo	6.4-13.0	(8)	63.6 ± 0.9	36.4 ± 0.9
Tronco del encéfalo	6.1-10.3	(4)	64.4 ± 2.3	35.6 ± 2.3
Cerebelo	4.1-7.6	(4)	81.0 ± 5.3	19.0 ± 5.3
Amígdala	4.3-8.2	(8)	80.1 ± 0.8	19.9 ± 0.8

Las actividades de las hexoquinasas de baja Km y la glucoquinasa se expresa en Medias ± Error estándar. En paréntesis el número de experimentos.

TABLA 2. *Parámetros cinéticos de la hexoquinasas de baja Km y de la glucoquinasa en fracciones solubles de hipotálamo.*

Actividad de glucoquinasa		Actividad de las hexoquinasas de baja K_m	
V_{max} (pmol NADPH/ min^{-1}/µg $proteina^{-1}$)	K_m para glucosa (mM)	V_{max} (pmol NADPH/ min^{-1}/µg $proteina^{-1}$)	K_m para glucosa (mM)
22.2	15.0	82.3	0.08

ciones de una mayor expresión de la GK en estados con alteraciones en los sistemas sensores de glucosa, tales como en la obesidad o situaciones posteriores a la hipoglucemia (25).

Mediante la utilización de distintas técnicas hemos encontrado la expresión de los ARN mensajeros y proteínas correspondientes a GLUT-2, GK (Figs. 1 y 2) y receptor de GLP-1 en el cerebro de humanos y ratas (6,9,10,17-19). De esta forma con la hibridación in situ hemos descrito la presencia de los ARN mensajeros de estas moléculas en distintas localizaciones del cerebro, con una alta proporción de células positivas en el hipotálamo. También con el uso de análisis RT-PCR y posterior separación con "Southern blot" de los productos obtenidos por PCR identificamos los ARN mensajeros de GLUT-2 y GK. La expresión de estos genes en cerebros de humanos y rata da lugar a las proteínas GLUT-2 y GK de 62 y 52 kDa respectivamente. Por otra parte una actividad fosforilante de glucosa con alta Km la encontramos en las mismas áreas cerebrales (Tablas 1 y 2). Pero la caracterización de estos compo-

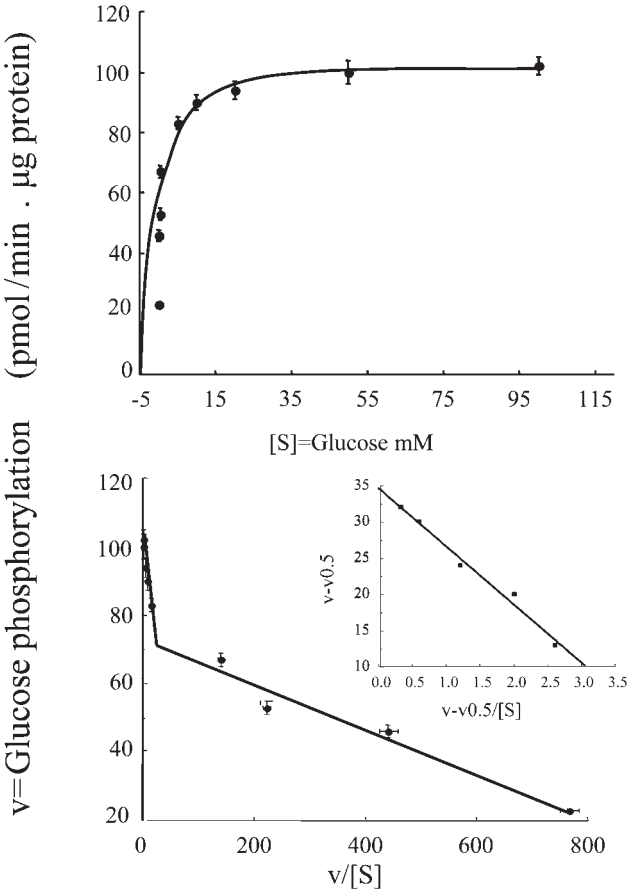


Figura 3. Análisis cinético de las actividades fosforilantes de glucosa en extractos solubles de hipotálamo.

nentes incluye no sólo el estudio de la expresión génica sino también las propiedades cinéticas de la enzima, porque como ocurre en la hipófisis de rata la presencia del ARN mensajero de GK no asegura la actividad fosforilante de glucosa. Tanto en el cerebro de humanos como de rata la GK (18,26) presenta propiedades cinéticas similares (Fig. 3) a las descritas previamente para la enzima de origen hepático o pancreático, con una alta Km para la glucosa y sin inhibición por la glucosa-6-fosfato. La contribución de la GK a la actividad fosforilante de glucosa total oscila entre el 30-10% en diferentes regiones cerebrales, en comparación con el 85% en hígado de rata o del 50-24% descrito en los islotes pancreáticos.

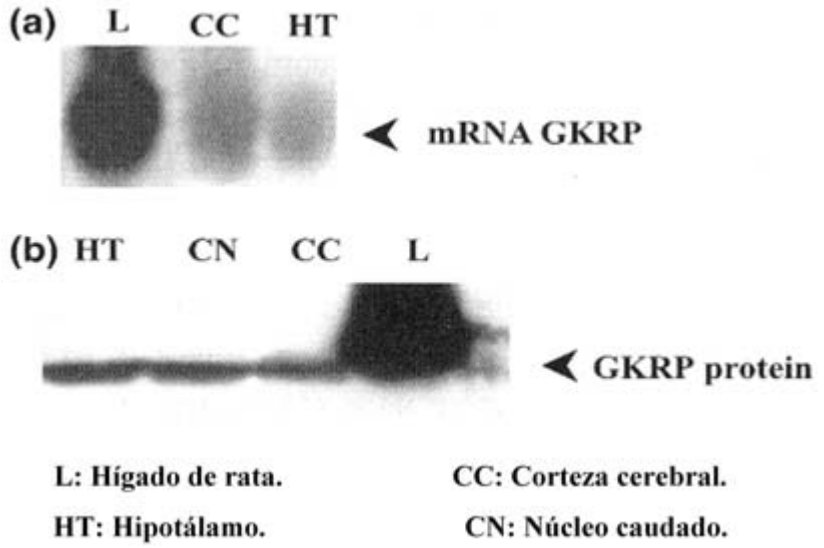


FIGURA 4. *Expresión del ARN mensajero y la proteína GKRP (proteína reguladora de la glucoquinasa) en cerebro humano e hígado de rata.*

Aunque la GK está codificada por un solo gen, la presencia de promotores alternativos permite la expresión de proteínas distintas en hígado por una parte y en los islotes pancreáticos y cerebro por otra. De esta forma las isoformas hepática (L1) y pancreática (B1) difieren en 15 aminoácidos en la porción N-terminal. Nosotros hemos encontrado un mismo patrón de los productos génicos de la GK en el hipotálamo y los islotes pancreáticos de rata, siendo la isoforma que codifica para B1 la más abundante y pequeñas las isoformas que codifican (26) para B2,P1, P2,P1/B2 y P2/B2. Los patrones distintivos de las isoformas de la GK pueden modular su actividad. De hecho la GK hepática es regulada por insulina, mientras que la isoforma de origen pancreático o cerebral parece que es regulada postranscripcionalmente por las concentraciones de glucosa. Estos hallazgos refuerzan la idea sobre el papel de la glucosa como una molécula de señalización en determinadas áreas cerebrales.

La actividad de la GK puede también ser regulada por la proteína reguladora de la glucoquinasa (GKRP), la cual (27) en presencia de fructosa-6-fosfato se une a la GK e inhibe su actividad, mientras que la fructosa-1-fosfato impide la formación del complejo. En hígado la translocación subcelular de la GK regula la actividad enzimática de acuerdo con las necesidades metabólicas de

las células. De esta forma, la GKRP está presente fundamentalmente en el núcleo, y la localización de ambas proteínas cambia en función del estado metabólico. Bajo una situación basal la GK y la GKRP están unidas en el núcleo celular, pero en el estado post-prandial, cuando las concentraciones de glucosa y fructosa aumentan, la GK es liberada de la GKRP y permanece libre en el citoplasma lista para fosforilar la glucosa. Estos hallazgos indican que la GKRP funciona como un inhibidor alostérico de la GK y también como un sensor metabólico. Estudios realizados en ratones con deficiencia de GKRP sugieren un papel regulador y estabilizador de esta proteína en el mantenimiento de una cantidad adecuada de GK en hígado.

También hemos caracterizado la expresión del ARN mensajero y la proteína de la GKRP (Fig. 4) en el cerebro de humanos y rata. Con la técnica de hibridación in situ encontramos el ARN mensajero en células situadas en distintas áreas cerebrales, localizadas en los mismos lugares donde la GK fue identificada. Además los estudios de RT-PCR del ARN total procedente de hipotálamo, islotes pancreáticos e hígado, tras el subsiguiente análisis de los productos obtenidos por PCR mediante "Southern blot", mostró la presencia del ARN mensajero de la GKRP en los tres tejidos. La secuenciación del ADN complementario de la GKRP amplificada a partir del hipotálamo de rata y los islotes pancreáticos indicó que uno de los ARN transcritos fue idéntico al ADN complementario clonado a partir del hígado (27). Asimismo hemos identificado otras dos isoformas.

La expresión del gen de la GKRP en el cerebro humano y de rata genera una proteína de 69 kDa, con una característica distribución subcelular. También la presencia de GK y GKRP en fracciones subcelulares similares en hígado y cerebro sugiere que ambas proteínas pueden tener las mismas interacciones en estos órganos.

Por otra parte desarrollamos un diseño experimental para elucidar las interacciones funcionales entre GK y GKRP. Para este propósito utilizamos la proteína glutatión S-transferasa unida a la GK hepática de rata (GST-rGKl), o con la GK de islotes pancreáticos humanos (GST-hGKi). Ambas proteínas se incubaron con extractos hipotalámicos, y entonces las proteínas unidas o no a la GKRP se aislaron con glut-agarosa. Ambos complejos GST-rGKl y GST-hGKi fueron capaces de precipitar a la GKRP de hipotálamo e hígado en presencia de fructosa-6-fosfato, aunque la cantidad de GKRP coprecipitada disminuyó con la presencia de fructosa-1-fosfato, indicando que la GK y la GKRP también interactúan en cerebro y pueden responder a los ésteres de fructosa (27).

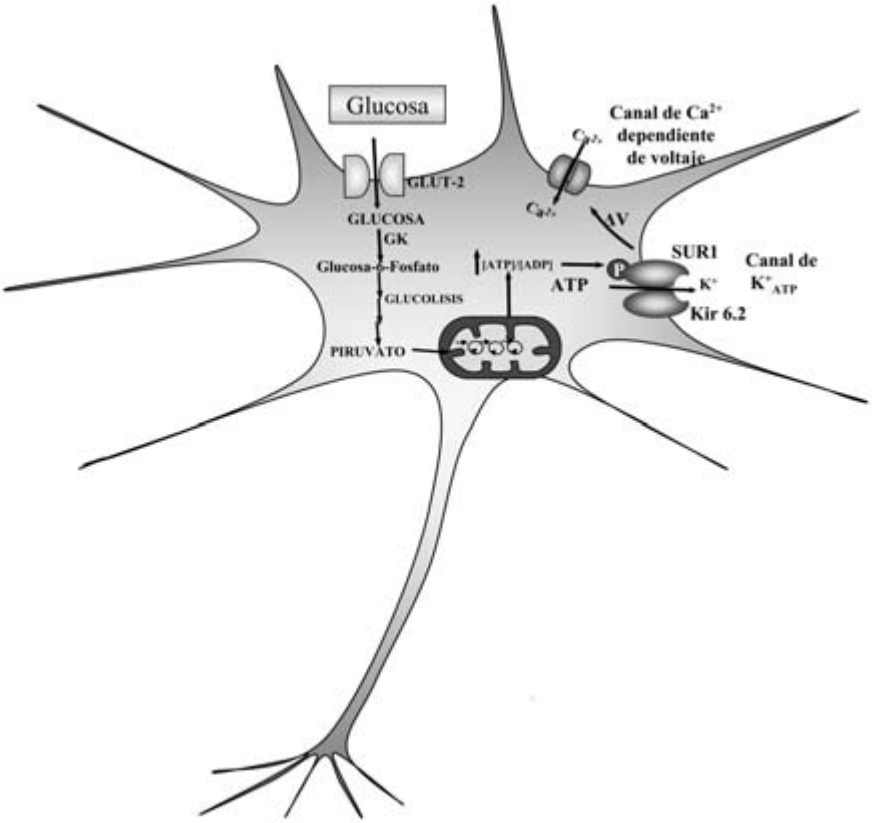


FIGURA 5. *Modelo propuesto para el funcionamiento de los canales de potasio y calcio en las neuronas estimuladas por glucosa (GE).*

Estos hallazgos ponen de manifiesto las interacciones entre GK y la GKRP, y la importancia que pueden tener en los mecanismos implicados en el reconocimiento de la glucosa. La GK cataliza el paso limitante en el catabolismo de la glucosa, y por ello es considerada como el auténtico sensor de glucosa. Esta enzima controla la oxidación de la glucosa y la formación de ATP necesaria para la actividad del canal de K^+_{ATP} en las neuronas (Fig. 5) que tienen GK. Esta también juega un papel regulador como consecuencia de su cooperatividad cinética con la glucosa, la ausencia de inhibición por glucosa-6-fosfato, y su baja afinidad por la glucosa, que asegura que el valor de la fosforilación de la glucosa sea directamente proporcional a los valores circulantes de glucosa y las concentraciones intracelulares de la enzima. En esta dirección tiene una especial relevancia la demostración de que la GK está presente tanto en las neuronas GE

como en las GI, donde puede jugar un papel importante en el reconocimiento de la glucosa.

EFECTOS DE LAS FLUCTUACIONES DE LA GLUCEMIA SOBRE LOS SISTEMAS SENSORES DE GLUCOSA EN CEREBRO

A pesar de que en condiciones basales la glucemia es de 5 mM, las concentraciones de glucosa encontrada en el fluido intersticial en cerebro son inferiores a 2 mM, lo cual es un reflejo indicativo de cuando los valores circulantes de glucosa oscilan entre 2,5 a 15 mM, las concentraciones cerebrales de glucosa sólo varían entre 0,15 y 4,5 mM. Estos hechos garantizan que las isoformas más abundantes en cerebro del transportador de glucosa GLUT-3, y la enzima fosforilante de glucosa HK-1, sean suficientes para producir la cantidad de ATP necesaria para mantener las funciones celulares bajo condiciones basales, aunque HK-1 esté saturada por debajo de 2mM. Por otra parte las fluctuaciones de la glucemia, desde las concentraciones bajas hasta las más elevadas, necesitan sistemas sensores de glucosa con objeto de obtener una respuesta fisiológica. Nuestros conocimientos actuales indican un papel sobresaliente al sistema nervioso central en la detección de las hipoglucemias, mediante la contribución de glucosensores hipotalámicos presentes en el hipotálamo ventromedial. Este es considerado un centro simpáticomimético con actividades reguladoras sobre la ingesta de alimentos, que cuando es estimulado facilita la liberación de las hormonas contrainsulares, catecolaminas y glucagón, que defienden el organismo de las situaciones de glucopenia.

Además la GK puede reconocer las elevaciones de la glucemia. como por ejemplo después de la ingesta de alimentos, cuando las interacciones de ella con la GKRP pueden facilitar el funcionamiento de los sistemas sensores de glucosa localizados en áreas selectivas del cerebro.

Estudios recientes realizados por nuestro grupo, con la utilización de la tecnología PET, muestran que el GLP-1 cuando administrado mediante perfusión intravenosa en humanos reduce significativamente el metabolismo cerebral de glucosa (Fig. 6) en áreas hipotalámicas y del tronco cerebral (18), implicadas en el control de la ingesta alimentaria. Teniendo en cuenta que para estos estudios utilizamos 18-F-desoxiglucosa, la radiactividad acumulada en las áreas cerebrales citadas sólo pudo almacenarse en forma de desoxiglucosa-6-fosfato, y por tanto sólo pudieron afectarse los sistemas de transporte y fosforilación de glucosa, que en las áreas citadas tienen células con un gran contenido de los

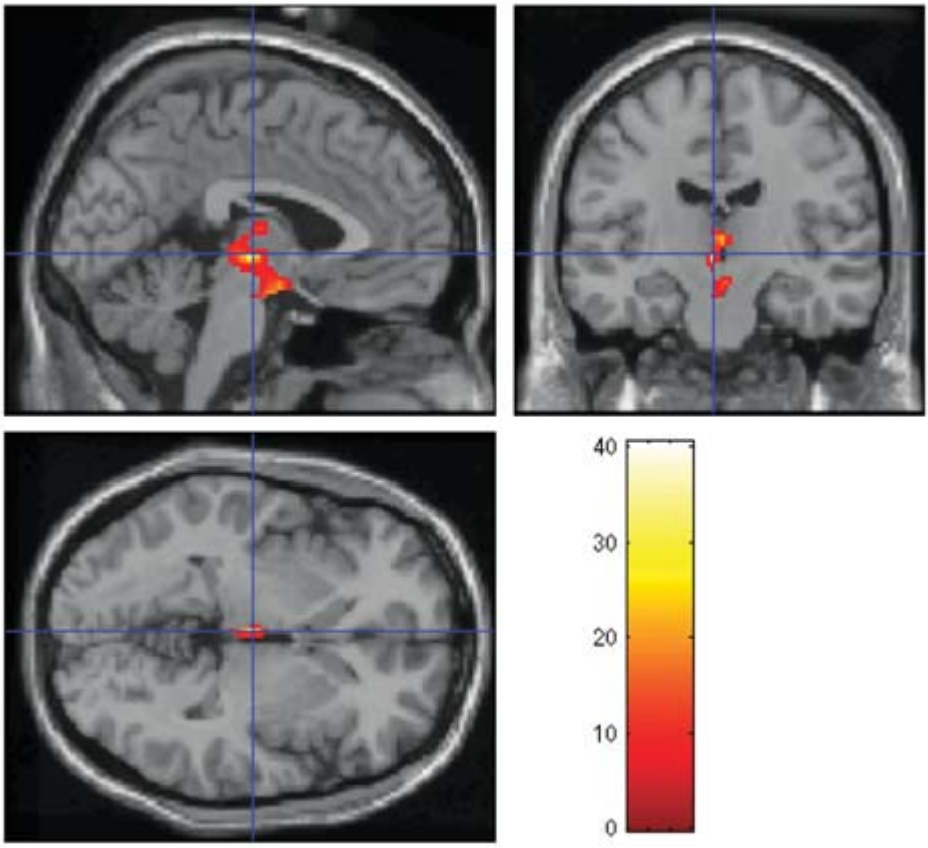


FIGURA 6. *Efecto del GLP-1 (7-36) amida sobre el metabolismo cerebral de glucosa evaluado mediante la tomografía de emisión de positrones (PET). Este péptido redujo significativamente el metabolismo de la glucosa en hipotálamo y tronco cerebral comparándolo con los datos obtenidos en sujetos controles sin la administración de GLP-1 (7-36) amida.*

componentes del sistema sensor de glucosa, GLUT-2 y GK. Esta constituye una primera aproximación en humanos sobre la acción de un péptido anorexígeno con el sistema sensor de glucosa, que abre nuevas vías para el estudio de otras moléculas anorexígenas y orexígenas en condiciones de normalidad y por extrapolación a otras situaciones patológicas como la anorexia y bulimia nerviosas y la obesidad compulsiva.

En resumen, una amplia red presente en el hipotálamo y el tronco del encéfalo comunican unas con otras para controlar la conducta alimentaria. Subpoblaciones de estas células constituyen circuitos con substancias orexígenas y anorexíge-

nas y sus receptores, capaces de generar respuestas integradas frente a diferentes estímulos producidos por modificaciones de distintos metabolitos. Estas respuestas pueden ser facilitadas por la expresión de GLUT-2, GK y GKRP en células hipotalámicas con capacidad sensora de las concentraciones circulantes de glucosa.

AGRADECIMIENTOS

Los estudios que se citan fueron realizados gracias a las ayudas del Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Ciencia e Investigación, Comunidad de Madrid y el CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), que es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Oomura, Y. y Yoshimatsu, H. (1984) Neural network of glucose monitoring system. J. Auton. Nerv. System. 10: 359-72.

(2) Oomura, Y. Ono, T., Ooyama, H. y Wayner, M.J. (1969) Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. Nature 222: 282-84.

(3) Leibowitz, S.F. (1992) Neurochemical-neuroendocrine systems in the brain controlling macronutrient intake and metabolism. Trends Neurs. 15:491-97.

(4) Batterham, R.L., Cowley, M., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., *et al*. (2002) Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. Nature 418: 650-54.

(5) Schwartz, M.W, Woods, S.C., Porte, D., Seely, R.J. Baslein, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. Nature 404: 661-71.

(6) Navarro, M., Rodríguez-Fonseca, F., Alvarez, E., Chowen, J.A., Zueco, J.A., Gómez, R., Eng, J. y Blázquez, E. (1996) Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells. Evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. J. Neurochem. 67: 1982-91.

(7) Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M.B., Meeran, K., Choi, S.J., *et al*. (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. Nature 379: 69-72.

(8) Orskov, C., Poulsen, S.S., Moller, M., y Holst, J.J. (1996) Glucagon-like peptide 1 receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide 1. Diabetes 45: 832-35.

(9) Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J.A., Thorens, B. y Blázquez, E. (1996) Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in the rat brain. J. Neurochem. 66: 920-27

(10) Rodríguez-Fonseca, F., Navarro, M., Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J.A.,Eng, J. y Blázquez, E. (2000) Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptors agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. Metabolism 49: 709-17.

(11) Kreymann, B., Williams, G., Gathei, M.A., y Bloom, S.R. (1987) Glucagon-like peptide-1 (7-36): a physiological incretin in man. Lancet 2: 1300-04.

(12) Holst, J.J., Orskov, C. (1994) Glucagon and other proglucagon-derived peptides. En Walsh J.H: y Docray G.J., eds. Gut peptides: Biochemistry and Physiology, New York, N.Y., Raven, p. 305.

(13) Schjöldager, B.T.G., Mortensen, P.E., Christiansen, J., Orskov, C. y Holst, J.J. (1989) GLP-1 (glucagon-like peptide-1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in man. Dig. Dis. Sci. 35: 703-08.

(14) Gutniak, M., Orskov, C., Holst, J.J., Ahrén, B. y Efendic, S. (1992) Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 326: 1316-22.

(15) Matchinsky, F.M. (1990) Perspectives in diabetes: glucokinase as a glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β-cells and hepatocytes. Diabetes 39: 647-52.

(16) Burcelin, R., Da Costa, A., Drucker, D., y Thorens, B. (2001) Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. Diabetes 50: 1720-28.

(17) Blázquez, E., Alvarez, E., Navarro, M., Roncero, I., Rodríguez-Fonseca, F., Chowen, J.A. y Zueco, J.A. (1998) Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide as a novel neuropeptide. Mol. Neurobiology 18: 157-73.

(18) Roncero, I., Alvarez, E., Chowen, J.A., Sanz, C., Rabano, A., Vázquez, P. y Blázquez, E. (2004) Expression of glucose transporter isoform GLUT-2 and glucokinase genes in human brain. J. Neurochem. 88: 1203-10.

(19) Alvarez, E., Martínez, M.D., Roncero, I., Chowen, J.A., García-Cuartero, B., Gispert, J.D., *et al*. (2005) The expression of GLP-1 receptor mRNA and proteín allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. J. Neurochem. 92: 798-806.

(20) Ashford, M.L.J., Borden, P.R. y Treherne, J.M. (1990) Glucose-induced excitation of hypothalamic neurons is mediated by ATP-sensitive K^+channels. Pfügers Arch. 415: 479-83.

(21) Dunn-Meynell, A.A., Rawson, N.E. y Levin, B.E. (1998) Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K^++ channel in rat brain. Brain Res. 814: 41-54.

(22) Yang, X.J., Kow, L.M., Funabashi, T., y Mobbs, C.H. (1999) V. Hypothalamic glucose sensor. Similarities to and differences from pancreatic β-cels mechanisms. Diabetes 48: 1767-72.

(23) Karschin, C., Ecke, C., Ascroft, F.M. y Karschin, A. (1997) Overlapping distribution of K^+ATP channel-forming unit Kir 6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR 1 in rodent brain. FEBS Lett. 401: 9-64.

(24) Niini, M., Sato, M., Tamaki, M., Wada, Y., Takskara, J. y Kansaniski, K. (1995) Induction of Fos proteín in the rat hypothalamus elicited by insulin-induced hypoglycemia. Neurosci. Res. 23: 36164.

(25) Dunn-Meynell, A.A., Routh, V.H., Kang, L., Gaspess, I. y Levin, L.E. (2002) Glucokinase is the likely mediator of glucose sensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. Diabetes 51: 2056- 65.

(26) Roncero, I., Alvarez, E., Vázquez, P. y Blázquez, E. (2000) Functional glucokinase isoforms are expressed in rat brain. J. Neurochem. 74: 1848-57.

(27) Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J.A., Vázquez, P. y Blázquez, E. (2002) Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. J. Neurochem. 80:45-53.

9. Efectos de la hormona de crecimiento y la melatonina sobre el Sistema Nervioso Central

JESÚS A.F. TRESGUERRES*, KIREEV R.,SALAZAR V.
Y ARIZNAVARRETA C.

Catedrático de Fisiología. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina*. Departamento Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid*

RESUMEN

Con la edad disminuyen una serie de hormonas tanto en el hombre como en los animales de experimentación y esta disminución está directamente relacionada con las alteraciones que se observan en diversos procesos fisiologicos con el envejecimiento. Las más importantes parecen ser GH y melatonina además de las hormonas sexuales. El envejecimiento del SNC determina una serie de cambios en su estructura y función que pueden estudiarse por un lado mediante la observación tanto del número total de neuronas presentes en el hipocampo, como de la neurogénesis. Además se investigan los fenómenos de estrés oxidativo e inflamación cerebrales que pueden explicar los fenómenos de apoptosis y deterioro funcional del SNC. En este capítulo se presentan una serie de datos que apoyan el papel que juegan la GH y la melatonina en la reversión parcial del deterioro del SNC asociado al envejecimiento. Se presentan los resultados obtenidos haciendo especial hincapié en los mecanismos moleculares que explican las acciones observadas.

Se han estudiado ratas machos y hembras de 22 meses, que fueron sometidos a tratamiento con cada una de dichas hormonas o bien con placebo durante 10 semanas. Se incluyeron como controles jóvenes de ambos sexos de 2 meses sin tratar. En el hipocampo el número de neuronas se mantiene estable hasta

que a los 22 meses comienza el proceso de apoptosis que conduce a una reducción en el número que se hace evidente a los 24 meses. También aparece con la edad pero con un comienzo mucho mas temprano una disminución de la neurogénesis en esa misma estructura. Todo esto ocurre a la vez que se incrementan los indicadores de estrés oxidativo en el cerebro como lipoperóxidos y NO sintasa inducible y aumentan también los indicadores de inflamación como TNF alfa, NFkB e interleukinas 1 y 6 El tratamiento con GH impide la disminución del número de neuronas pero no aumenta la neurogénesis por lo que parece actuar exclusivamente disminuyendo la apoptósis. Esto parece confirmarse porque en los homogenizados cerebrales hay un aumento de Bcl2, sirtuina y glutatión peroxidasa, y una disminución de caspasas 3 y 9 y de nucleosomas. A la vez descienden los indicadores de estrés oxidativo y de inflamación. La melatonina actúa por el contrario estimulando la neurogénesis y mucho menos sobre apoptósis. De hecho no son capaces de evitar la caida en el numero total de neuronas, aunque si son capaces de reducir el estrés oxidativo y la inflamación. Por todo ello los tratamientos hormonales mencionados son capaces de mejorar los síntomas del envejecimiento en el hipocampo del SNC bloqueando los mecanismos moleculares de inducción de estrés oxidativo y apoptósis.

ABSTRACT

Age is associated with the reduction of several hormones both in humans and experimental animals and this reduction seems to be associated with the alterations observed in several physiological processes. GH and melatonin in addition to sexual hormones seem to be the most important. Aging in the CNS determines some changes in its structure and function that can be studied by the observation of the total number of neurones in the hippocampus and by estimating neurogenesis. In addition oxidative stress processes and inflammation, that could explain apoptosis and functional damage to the brain can be also investigated. In this chapter data are presented supporting the positive role of GH and melatonin treatments in partially reverting the age associated brain damage. The molecular mechanisms that could explain the observed effects, has been emphasized.

Male and female rats of 22 months of age have been treated with GH, melatonin or placebo for 10 weeks. Young animals of both sexes of 2 months without treatment have also been included as controls. Results show that he number of neurones in the hippocampus remains stable until 22 months of age and then an apoptotic process starts that reduces its number, the fall being signifi-

cant at 24 months of age. Also a reduction in neurogenesis can be observed in the same structure but starting much earlier. At the same time markers for oxidative stress, such as lipoperoxides and iNO synthase or inflammation such as TNF alpha, NFkB, and interleukins 1 and 6 are increased in brain homogenates. GH treatment prevents the observed fall in the number of neurones but without enhancing neurogenesis so it can be only explained by a reduction of apoptosis. This seems to be confirmed by the observed increase in Bcl2, sirtuin, glutathione peroxidase, and the reduction in nucleosomes and caspases 3 and 9. At the same time, markers for oxidative stress and inflammation show a marked reduction. Melatonin on the contrary stimulates neurogenesis and has a less important effects on apoptosis so that the total number of neurones continues to fall. However a significant reduction on oxidative stress and inflammation has been also detected. In conclusion both hormonal treatments were able to ameliorate aging associated alterations in the hippocampus of the CNS by blocking molecular mechanisms of oxidative stress and inflammation

INTRODUCCIÓN

El cerebro presenta dos fases de desarrollo: una primera fase en que experimenta un crecimiento rápido hasta alcanzar los 20-25 años; y una segunda fase en que el crecimiento no sólo se frena, sino que incluso se produce una involución. Durante el envejecimiento el cerebro sufre una serie de alteraciones estructurales, tanto macroscópicas como histológicas y bioquímicas. Según múltiples autores, a partir de los 50 años el volumen cerebral disminuye alrededor de un 2% por década y, como consecuencia, el volumen de la cavidad extracerebral aumenta de manera progresiva y paralela a partir de esta edad. A los 80 años, alcanza una pérdida de entre un 10-15% de su peso máximo en la juventud, observándose un aumento en el tamaño de los surcos, una disminución de las circunvoluciones cerebrales así como un significativo aumento del tamaño de los ventrículos cerebrales.

Estudios recientes indican que el grado de déficit cognitivo y la presencia de marcadores neuropatológicos (como las placas neuríticas) en enfermos de Alzheimer, podría estar relacionado con la degeneración o incluso atrofia de neuronas colinérgicas Aparte de las alteraciones celulares descritas anteriormente en la porción basal del prosencéfalo, se ha observado la presencia de terminales colinérgicos altamente engrosados en el neocortex de animales viejos, que pueden asociarse en forma de placas adoptando una morfología muy similar a la de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, a pesar de que distintas pruebas tintoriales demuestran que carecen de sustancia amiloidea (1). En con-

clusión, parece que con la edad se producen una serie de alteraciones a nivel neuronal, como la degeneración y atrofia de las células colinérgicas, que están directamente relacionadas con la aparición de ciertos déficits cognitivos observados durante el envejecimiento, tanto en humanos como en la rata.

A pesar de que en la mayor parte de las áreas cerebrales no existe una pérdida neuronal masiva con la edad (2, 3), se ha observado la existencia de una reducción muy significativa del número de neuronas en el hilus del giro dentado del hipocampo en los ancianos (4) así como en ratas machos Fischer 344 de 24 meses de vida (5).

Por otra parte, varios autores sugieren que la pérdida de capacidades cognitivas con la edad, sea debida no sólo a un descenso en el número de neuronas del hipocampo, sino a una pérdida de sinapsis en este área cerebral, lo que conllevaría una clara pérdida de capacidad funcional por parte de esta estructura cerebral (6).

El SNC es un tejido diana para varias hormonas entre las que se encuentra la GH (7). El defecto de GH se asocia a alteraciones del sueño, con pérdida de memoria, sensación de bienestar disminuida y otras alteraciones cognitivas (8, 9,10). Tanto memoria como las performances cognitivas de los pacientes con déficit de GH se mejoran con el tratamiento de sustitución con GH (8,11, 12, 13, 14,15).

En varios modelos animales la GH protege el cerebro y la médula espinal de los distintos tipos de degeneración y es capaz de promover la supervivencia de las neuronas tras un insulto hipóxico-isquémico (16, 17, 18, 19). Este efecto neuroprotector de la GH sugiere que la disminución de esta hormona con la edad (20) o en otras circunstancias, puede afectar al cerebro y contribuir al deterioro del mismo (21, 22, 23).

El hipocampo es un área cerebral relacionada con la memoria episódica y espacial (24) que se deteriora con la edad de forma paralela a las habilidades cognitivas (23,25). Se ha visto una disminución significativa con la edad en el número de neuronas de esta zona, y concretamente en el hilus del giro dentado, tanto en humanos como en la rata Fischer 344 (5). También nuestro grupo ha podido comprobar dicha disminución en las ratas Wistar, tanto machos como hembras. El tratamiento con GH a dosis que consiguen restaurar los niveles de IGF I plasmáticos hasta alcanzar los que presentan los adultos jóvenes, es capaz de evitar la disminución del número de neuronas con la edad (26, 27). El mecanismo neuroprotector de la GH parece más bien relacionado con la disminución de la apoptosis de las neuronas que con el incremento de la neurogénesis. En ambos casos está mediada por el estímulo de IGF-I, bien sea el de origen hepático, que pasa

a la circulación y cruza la barrera hemato-encefálica, o el generado directamente en el tejido nervioso bajo el estímulo de la GH (28, 29).

La melatonina ha demostrado tener efectos protectores en diversas enfermedades y modelos experimentales en los que el daño inducido por los radicales libres juega un papel fundamental, protegiendo del daño oxidativo a las macromoléculas celulares (DNA, lípidos y proteínas) (30). En este sentido, la melatonina es capaz de reducir el daño oxidativo en modelos de isquemia/reperfusión en diversos órganos incluyendo el SNC, o bien tras exposición a tóxicos (cianuro, paraquat, ciclofosfamida) toxinas bacterianas o a metales pesados. Tambien protege frente a la proteína β-amiloide (como modelo de enfermedad de Alzheimer), al MPTP (como modelo de Parkinsonismo), o a la excitotoxicidad inducida en el SNC por ácido kaínico, etc. (31, 32,33). De hecho ha llegado a utilizarse como tratamiento coadyuvante en isquemia/reperfusión transitoria en el cerebro (32).

Nuestro grupo ha investigado también el efecto de la melatonina sobre el SNC observando que no es capaz de evitar la disminución del número de neuronas en el hilus del giro dentado como hacía la GH pero si estimula significativamente la neurogenesis (27).

HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

La GH es la hormona más abundante en la hipófisis (5 - 10 mg / glándula). Hay varias formas moleculares, pero la forma principal tiene 191 aminoácidos (Pm 22.650 kDa) y se sintetiza en las células acidófilas. Su gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (34).

La GH de mamíferos es activa en numerosas especies, pero en el ser humano solo es activa la procedente de humanos o de primates (35), o sea que presenta específicificidad de especie.

Los niveles plasmáticos basales de GH oscilan entre 1 y 5 ng/ml, aunque durante la pubertad se producen incrementos importantes. Su secreción es pulsátil, con picos cada 3-4 horas que son más frecuentes pero menores en las hembras (36). La máxima secreción de GH tiene lugar en las dos primeras horas de sueño nocturno, durante el sueño de ondas lentas.

Básicamente, la secreción de GH está regulada por el hipotálamo, a través de tres péptidos: *La Somatostatina (SS), la Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH),* y la *Ghrelina*. Esta última recientemente descubierta es un peptido de 28 aminoacidos aislado originalmente de la pared gástrica (37) pero que

también está presente en el hipotalamo y que es el ligando natural del receptor de la hexarelina (38), sustancia que también estimula la secreción de GH.

La secreción episódica de GH resulta de la interacción entre las secreciones de GHRH estimulante y de SS inhibidora donde posiblemente esta última tenga un papel preponderante (39). Parece que este patrón secretor pulsátil es tanto o más importante para las acciones hormonales periféricas que la cantidad total de GH secretada.

La secreción de GH se estimula por el estrés, el ejercicio físico, la hipoglucemia,y algunas drogas, como la bromocriptina; mientras que el aumento de la glucosa sanguínea inhibe su secreción. El descenso de ácidos grasos libres (AGL) estimula la secreción de GH y anula su pulsatilidad.

La secreción de GH también está influida por el sistema endocrino (40):

Los péptidos opioides al igual que otros, como la galanina y la leptina, estimulan la secreción de GH.

Las hormonas tiroideas modulan la expresión del gen de GH; por eso los individuos hipotiroideos presentan también un defecto de crecimiento.

Los glucocorticoides en dosis bajas estimulan la secreción de GH, pero los niños tratados crónicamente con dosis farmacológicas muestran una marcada deficiencia de talla (41).

Respecto a los esteroides sexuales, existe un claro dimorfismo sexual en cuanto a su influencia sobre la secreción de GH, que puede ser la causa de las diferencias en el patrón de crecimiento de ambos sexos. Cuando los esteroides sexuales se secretan durante la pubertad, los cartílagos de crecimiento de los huesos largos se cierran y el crecimiento termina.

También diversos *neurotrasmisores* suprahipotalámicos influyen en su secreción.

Tras su secreción, la GH se une en el plasma a proteínas transportadoras (GH-BP). La GH se elimina fundamentalmente por el riñón, pero solo se filtra la fracción no unida a proteínas (42).

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA GH

El receptor para la GH (GHR) es una proteína codificada por un gen situado en el cromosoma 5. Su cantidad es escasa durante la época postnatal, y va aumentando a lo largo del primer año de vida. Una molécula de GH interac-

ciona con dos de GHR, que al dimerizarse pone en marcha una cascada de señales celulares mediante mecanismos JAK y STAT dependientes (42).

En respuesta a la secreción de GH, se sintetizan y liberan en numerosos tejidos (hígado, hueso, músculo, etc.) péptidos con actividad hormonal que median una gran parte de las acciones de la GH. Se les denominó somatomedinas, pero hoy se prefiere el nombre de Insulin-like Growth Factors (IGFs), debido a que presentan una marcada analogía con la insulina. Las más importantes son la IGF I y la IGF II. El 95 % de la IGF circula unida a diversas proteínas transportadoras (IGFBPs), de las cuales la más importante es la IGFBP-3, cuyos niveles están controlados también por la propia concentración de GH, y nos sirven como marcador de su actividad.

De cualquier forma, el papel más destacado de la IGF lo lleva a cabo la generada en cada tejido en respuesta a la GH y que actúa de forma paracrina (43).

El receptor de IGF se encuentra en la superficie de las células y es semejante al receptor de la insulina en su estructura y en la secuencia de aminoácidos (44). Esta similitud hace que exista una importante interacción entre ambas hormonas, sobre todo a concentraciones elevadas.

La IGF media muchas de las acciones de la GH, existiendo una teoría dual de las acciones de ambas hormonas, de forma que en el crecimiento óseo por ejemplo, la GH estimula la diferenciación de diversos tipos celulares, mientras que la IGF-I tendría efectos mitogénicos y multiplicadores sobre las células diferenciadas. Así, actuaría de forma paracrina en el cartílago de conjunción, estimulando la multiplicación de los condrocitos.

Las acciones de la IGF son distintas dependiendo de la duración del estímulo (42): Las acciones agudas producen efectos semejantes a los de la insulina, mientras que las crónicas o prolongadas incluyen síntesis de DNA y proliferación celular. Es lo que sucede durante el crecimiento óseo y del resto de tejidos.

Efectos de la GH

La GH es una hormona anabólica, que estimula la incorporación de aminoácidos en el músculo, la síntesis proteica y la formación de colágeno extracelular, e inhibe el catabolismo proteico. Ésto provoca un balance positivo de nitrógeno y de fósforo y una caída en los niveles sanguíneos de urea y de aminoácidos (45). En los adultos, la GH colabora en el mantenimiento de la composición corporal y promueve la reparación de los tejidos (46). La GH es una

hormona lipolítica que induce la rotura de triglicéridos formándose glicerol y AGL, que sirven de sustratos para la neoglucogénesis. También estimula la oxidación de ácidos grasos en lugar de carbohidratos o proteínas, efecto que es más importante en periodos de ayuno. También se sabe que, en cantidades elevadas, tiene efecto diabetogénico.

La principal función de la GH es el fomento del crecimiento durante la infancia y adolescencia, en colaboración con otros factores como la nutrición y las hormonas sexuales y tiroideas. Como hemos visto, la GH es una hormona anabólica, que estimula la incorporación de aminoácidos y la síntesis proteica en las células, produciendo un aumento de tamaño y multiplicación de las mismas. Actuando sobre los cartílagos de crecimiento, induce un incremento de tamaño de los huesos largos durante la infancia y hasta la pubertad, momento en el que estos se cierran, osificándose por acción de las hormonas sexuales. También estimula el crecimiento muscular.

El déficit de secreción de GH en la infancia produce enanismo por falta de estímulo sobre los cartílagos de conjuncion, mientras que el exceso produce gigantismo. Si hay hiperproducción de GH antes de que los cartílagos de crecimiento se hayan cerrado, los huesos largos crecen más de lo normal. La consecuencia es una talla excesivamente alta y disarmonía corporal. En el adulto, el exceso de producción de GH no puede estimular el crecimiento pero si produce acromegalia (47).

De la misma forma se ha descrito un síndrome específico debido al déficit de GH del adulto (48). Se caracteriza por una alta incidencia de dislipemia, intolerancia a la glucosa, obesidad de tipo central, debilidad muscular, fatiga, disminución de la densidad ósea (49) hipertensión y alteraciones neuropsiquiátricas (13) Éstos individuos desarrollan aterosclerosis tempranamente, incrementándose la morbi-mortalidad cardiovascular (50,51). La terapia sustitutiva en estos pacientes ha demostrado tener claros efectos beneficiosos, mejorando ostensiblemente los parámetros previamente deteriorados (13, 52, 53, 54, 55, 56, 57). De ahí que ya esté aprobada la terapia sustitutiva con GH en este tipo de pacientes en varios países, entre ellos España.

DISMINUCIÓN FISIOLÓGICA DE LA SECRECIÓN DE GH CON LA EDAD (SOMATOPAUSIA)

La secreción de GH y los niveles plasmáticos de IGF-I disminuyen con la edad de forma parecida a como veremos mas adelante que hace la melatonina,

presentando los ancianos niveles muy disminuidos respecto de los de individuos jóvenes (51). Este hecho, unido a los cambios metabólicos y de composición corporal que acompañan al envejecimiento, como disminución de masa muscular y ósea, aumento de la adiposidad, etc., ha llevado a relacionar dichos cambios metabólicos con la disminución de GH e IGF-I, llegándose a acuñar el término "somatopausia" para referirse a este fenómeno(58). Por tanto, podría considerarse el envejecimieto como una forma fisiológica de "déficit de GH del adulto".

Se ha intentado dilucidar el posible mecanismo de esta disminución de la secreción de GH. La hipótesis más verosímil parece ser aquella que apunta al hipotálamo como punto en el que se genera la somatopausia. Así, la disminución de la liberación de GHRH (59) y/o un aumento de la producción de SS (60) podrían ser los responsables de la disminución de los niveles de GH. Es también necesario recordar que la secreción de GH depende del sueño de ondas lentas (61). Con la edad, se produce una disminución de la duración de esta fase del sueño, provocado entre otros por una disminución de la secreción de la melatonina (62). Este fenómeno podría estar relacionado con la disminución de la producción de GH que se observa con la edad.

A partir del trabajo de Rudman y cols. (63), que se ha convertido en un "clásico", se ha planteado la terapia sustitutiva con GH en ancianos, y la mayoría de los estudios demuestran sus efectos beneficiosos. Así, la administración de GH a dosis bajas en hombres mayores de 60 años restaura los niveles de IGF-I hasta prácticamente los que existen en jóvenes (64) y, como veremos, parece tener efectos beneficiosos evidentes. Por ejemplo modifica la composición corporal y los niveles de lípidos plasmáticos en ancianos, ya que aumenta la masa magra, disminuye la masa grasa, reduce los niveles de colesterol y mejora la relación HDL/LDL (63,65). Pero esta terapia no está exenta de efectos secundarios que han de ser tenidos en cuenta. Así, tratamientos a dosis elevadas durante períodos de tiempo prolongados pueden producir disminución de la sensibilidad a la insulina e intolerancia a la glucosa, síndrome del túnel carpiano y retención de líquidos, si bien estos síntomas son poco frecuentes y de entidad menor a las dosis usuales(63,66).

Los experimentos con animales corroboran estos datos. Así, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento con GH a ratas viejas, tanto machos como hembras, disminuye la proporción de grasa corporal y aumenta la masa magra (67,68). Además de tener efectos beneficiosos sobre la función cardiovascular (69) sobre la piel (70) y sobre la función inmunitaria (71,72).

MELATONINA

La melatonina es una hormona de naturaleza indólica secretada básicamente por la glándula pineal, aunque también está presente en otros tejidos, donde ejerce probablemente un efecto local o paracrino. La melatonina está íntimamente implicada en la regulación de los ritmos biológicos, si bien en los últimos años ha sido objeto de mayor atención por parte de la comunidad científica a raíz del descubrimiento de sus propiedades antioxidantes.

La glándula pineal (73) está constituida fundamentalmente por *pinealocitos*, que constituyen el 80% del componente celular de la glándula en los mamíferos. En el hombre adulto, pesa 100-200 mg. Es un importante regulador de los ritmos biológicos anuales y circadianos, y constituye el nexo entre las señales luminosas del medio ambiente y los sistemas nervioso central y endocrino, a través de la secreción de la hormona *melatonina*, cuya producción está regulada por el estado de iluminación ambiental.

La melatonina se sintetiza a partir de triptófano, primeramente a través de su hidroxilación y decarboxilación a serotonina, y luego mediante la N-acetilación y O-metilación de la serotonina a melatonina. Se secreta desde la glándula pineal hacia la circulación, donde presenta un ritmo circadiano, con máximos durante el periodo de oscuridad. La producción de melatonina responde primariamente a estímulos lumínicos así, dicha producción está regulada por la longitud del fotoperiodo y es evidente durante la oscuridad. (32, 73). De esta forma, la información sobre el estado de luz/oscuridad ambiental llega a la glándula pineal y determina el ciclo de la síntesis de melatonina.

Dada su naturaleza hidro y lipofílica y su pequeño tamaño, atraviesa todas las membranas celulares con facilidad, llegando hasta el "último rincón" del organismo, como pueden ser las mitocondrias (73). Como se comentó anteriormente, la melatonina presenta un ritmo circadiano, con valores máximos nocturnos, con un pico máximo entre las 2 y las 6 de la mañana. La amplitud del ritmo de melatonina está influenciado por factores como la edad, disminuyendo de forma progresiva hasta ser muy baja en ancianos (73, 74).

ACCIONES DE LA MELATONINA

La función más conocida de la melatonina es su papel como regulador de los ciclos biológicos, a través de la codificación de la señal luminosa constituida por la longitud del fotoperiodo en una señal bioquímica. Se constituye así en uno de los

sincronizadores internos más importantes, al modular la actividad del núcleo supraquiasmático, que parece ser el "marcapasos central" o "reloj biológico" (32).

En este sentido, la melatonina parece estar implicada en fenómenos como la sincronización circadiana, la inducción del sueño, la regulación de la temperatura corporal y también la regulación del sistema inmunitario (73, 74).

Las propiedades antioxidantes de la melatonina dependen tanto de su efecto directo sobre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como de su acción sobre la expresión y actividad de enzimas involucrados tanto en la defensa antioxidante como en la generación de radicales libres. Descritas por primera vez a principios de la década de los 90 (75,76), se sabe que la melatonina actúa como neutralizador directo de diversas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como el radical $^{\bullet}OH$, el H_2O_2, el $^1O_2$, el ión $ONOO^-$, el radical $LOO^{\bullet}$, el peroxinitroso (ONOOH), incluso el NO (32,74, 77,78,79), a través de mecanismos independientes de receptor.

El hecho de que la melatonina sea una molécula pequeña lipo- e hidrofílica hace que atraviese las barreras biológicas y las membranas celulares con facilidad, difundiendo a todos los compartimentos intracelulares y concentrándose especialmente en el núcleo y la mitocondria, lugares en los que la producción de radicales libres es más intensa y el daño oxidativo, de repercusiones más importantes. En definitiva, la melatonina es capaz de llegar hasta el mismo lugar donde se generan los radicales libres, neutralizándolos antes de que puedan difundir y dañar estructuras celulares. Pero, además de sus acciones como neutralizador directo de radicales libres, la melatonina también actúa como antioxidante indirecto, induciendo la síntesis y reciclaje enzimático del glutatión reducido (GSH) mediante la estimulación de la actividad de los enzimas implicados en estos procesos Glutation peroxidas (GPx,) glutatión reductasa (GRd) y glutatión 6 fosfato deshidrogenasa (G6P-DH,) que genera el NADPH que emplea la GRd como cofactor a través de mecanismos mediados por receptor. Además, también estimula la expresión de la superoxidodismutasa (SOD) y la actividad de la catalasa, que son otros enzimas implicados en los procesos de detoxificación de radicales libres (30, 74, 78, 79). Nuestro grupo ha corroborado todos estos resultados habiendo demostrado una acción especifica a nivel tanto hepático, como cardiaco (80,81), y dérmico (70).

MELATONINA Y ENVEJECIMENTO

En humanos, los niveles de melatonina en plasma comienzan un descenso a partir de los 25-35 años, y a la edad de 40-60 años se tienen unos niveles que son

un 35-50% de los presentes en individuos jóvenes (74, 82) Y casi más llamativo que la reducción de los niveles es la disminución del pico nocturno (83), limitando su capacidad de sincronización de los ritmos circadianos. De hecho, a partir de los 40-50 años comienzan a alterarse y desincronizarse nuestros ritmos, lo que genera alteraciones funcionales, conductuales y de adaptación, que constituyen signos de envejecimiento (74). Paralelamente a esta disminución de la secreción de melatonina, se produce un incremento de la tasa de producción de radicales libres, y una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes, como SOD, GRd, y GPx, que están en parte regulados por la propia melatonina. El papel relevante de la melatonina en la regulación del estrés oxidativo parece cada día más evidente.

Por último, mencionar que se ha encontrado una correlación entre los niveles séricos de melatonina y la capacidad antioxidante total del suero en humanos y en ratas, y ambos parámetros disminuyen de forma paralela con la edad. Por tanto, parece que la reducción de los niveles séricos de melatonina se correlacionan con una disminución de la capacidad del suero para neutralizar los radicales libres y especies reactivas (84). Asumiendo reducciones tisulares similares en los niveles de melatonina, cabe especular que uno de los factores por los que los individuos viejos presentan un mayor daño oxidativo podría ser la disminución de la producción de melatonina inducida por la edad (78).

EFECTOS DE LA GH Y LA MELATONINA SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO EN EL ENVEJECIMIENTO

Efecto del tratamiento con GH

Los efectos neuroprotectores de la GH se han visto considerablemente consolidados a la luz de los hallazgos obtenidos por numerosos grupos en los últimos años. La GH es un reconocido factor neuroprotector no sólo del SNC sino también de la médula espinal en animales jóvenes (16, 17,18, 19) e incluso es capaz de impedir la pérdida neuronal en el hipocampo tras una lesión de hipoxia-isquemia de carácter unilateral (19).

En nuestro laboratorio hemos estudiado el efecto de la GH sobre el SNC y mas concretamente se ha determinado el número de neuronas en el hilus del giro dentado en cortes de cerebro sometidos a tinción de Nissl. También se ha determinado la neurogénesis utilizando tinciones con Bromodesoxi Uridina (BrdU). La utilización del disector óptico permite contar las neuronas en cortes del hilus del giro dentado del hipocampo teñidos con azul de Nissl. Se ha visto que en esta estructura existen diferencias en el número de neuronas entre machos y hembras a

FIGURA 1.-A. *Evolucion del numero de neuronas totales del hilus del giro dentado con la edad y efecto del tratamiento con GH*. B. *Efecto de la edad sobre la neurogénesis en funcion del numero de células BrdU positivas y ausencia de efcto del tratamiento con GH*.

favor de los primeros a todas las edades estudiadas ($p<0.01$). (26, 85). Dentro de cada sexo, el número de neuronas en el hilus se mantiene en un nivel similar entre los 3 y los 22 meses de edad. Por el contrario, hay una pérdida neuronal significativa entre los 22 y los 24 meses de similar magnitud en ambos sexos ($p<0.01$) similar a la reportada anteriormente por Shetty y Turner (5). (Fig. 1A)

No se han encontrado diferencias significativas en el número de neuronas entre las ratas hembras castradas y sin castrar (26) a pesar de lo que podría pensarse de los datos de la literatura (86, 87).

Si estudiamos las células BrDU positivas que suponen un indicador de neurogénesis, pasamos de alrededor de 3000 nuevas células a los 2 meses de edad a 80 células nuevas a los 24 meses con pocas diferencias entre sexos, y de nuevo sin que la ovariectomía tenga un efecto importante (88). (Fig. 1B)

En todos nuestros estudios el tratamiento con GH se administra durante 10 semanas a los 22 meses de vida tanto a, ratas machos como también a dos gru-

pos de ratas hembras, uno castrado desde los 12 meses y otro que permanece intacto. Los parámetros analizados en el grupo de los machos son el número total de neuronas del hilus del giro dentado tras el tratamiento, el recuento de células BrdU(+) en el giro dentado y la estimación de los niveles de nucleosomas y de Bcl-2 en un homogenado cerebral. En las hembras tanto castradas como intactas, se analizan estos mismos parámetros pero se va un poco más lejos al realizar algunas determinaciones bioquímicas que permiten sugerir la participación de ciertos mecanismos de acción a nivel molecular como consecuencia del tratamiento crónico con GH. Así, en los dos grupos de hembras se han realizado determinaciones de los niveles de expresión de caspasa 3 y 9 en sus isoformas activa e inactiva; de la expresión de dos enzimas antioxidantes como son Mn-SOD y GPx y por último, de la expresión de sirtuina (Sir2).

El tratamiento con GH (7) permite observar un incremento significativo de las neuronas totales a los 24 meses pero no aumenta el número de células BrDU positivas por lo que el efecto parece ser antiapoptótico (26) como ya habían sugerido otros autores (28, 89) (Figs. 1 A y B). Esto parece confirmarse con la disminución que puede observarse en los indicadores de apoptosis como son los nucleosomas, la caspasa 9 y la caspasa 3 y el incremento de las sustancias antiapoptoticas como Bcl 2 o Sirtuina como ha podido verse en homogeneizados de cerebro.Hay que señalar un hecho muy significativo, este fenómeno se aprecia por igual en los tres grupos de animales analizados, es decir en machos, hembras intactas y hembras ovariectomizadas (Figs. 2 A y B).

En el grupo de hembras castradas observamos, por otra parte, dos fenómenos. En primer lugar, que los niveles de caspasa-3 y caspasa-9 en hipocampo son significativamente menores que en las hembras intactas de su misma edad. Esto podría indicar que en ausencia de estrógenos endógenos, la apoptosis que reflejan los niveles elevados de nucleosomas debe tener lugar por mecanismos distintos a la participación de caspasa-3 y caspasa-9, que sería interesante estudiar en el futuro. Además no se aprecia efecto alguno del tratamiento con GH sobre los niveles de caspasa-9 y caspasa-3. Este hecho es fácilmente explicable, pues si la expresión de ambas es baja en los animales no tratados hace difícil pensar que estén interviniendo en el proceso de apoptosis en el hipocampo y es lógico no obtener un descenso adicional tras el tratamiento. Asimismo, esta ausencia de respuesta a la administración de la GH podría deberse a la disminución de la presencia de estrógenos, pues no ocurre en las hembras castradas y sí en las intactas que mantienen sus estrógenos endógenos ováricos.

Los mecanismos implicados en este fenómeno de neuroprotección de la GH a nivel del hipocampo en animales viejos deben aún ser estudiados en profun-

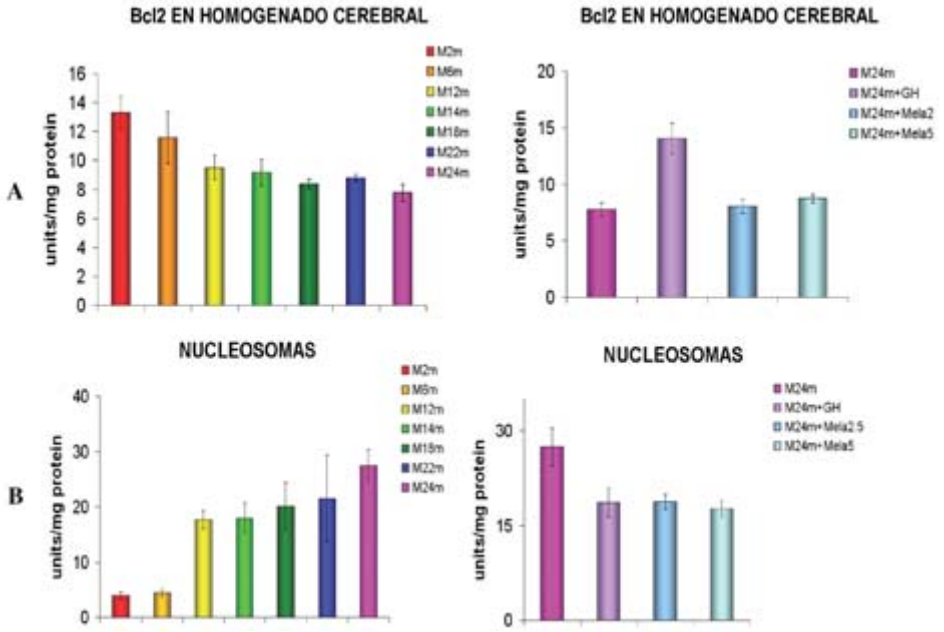


FIGURA 2.-A. *Evolucion de los niveles de BCL2 en homogenado de cerebro de rata y efecto estimulante de la GH sobre estos, con ausencia de efecto de la melatonina*. B. *Evolución de los nucleosomas como indicadores de apoptosis en el cerebro y disminución de los mismos tras el tratamiento con GH o melatonina*.

didad pero podemos apuntar algunas hipótesis. En animales jóvenes, los efectos neuroprotectores de la GH parecen estar mediados, por lo menos en parte, por la activación de los receptores de GH (19). Es decir, habría que pensar en una posible acción directa de la GH sobre las neuronas a través de sus receptores en las diversas estructuras cerebrales. En relación a esta posibilidad encontramos varios estudios que apoyan esta idea. Vázquez y cols. (90) han demostrado que la GH es capaz de ejercer una acción mitogénica induciendo un aumento en la expresión del péptido c-myc, un marcador del ciclo celular que sincroniza la transición de la fase GO-G1 del ciclo celular a la fase S, en la síntesis del ADN. Esta sincronización de las células en la misma fase (fase S) del ciclo celular podría hacerlas más resistentes a los daños infligidos por estrés oxidativo al que a lo largo de la vida se ve expuesto el cerebro senescente. Otro posible mecanismo de neuroprotección sería la proliferación de las células gliales causada por la GH, debido al papel fundamental ejercido por la glía en el intercambio de iones entre las células de la corteza y el espacio intercelular (91). De hecho, se sabe que *in vitro* la glía ejerce una función protectora al captar el glutamato extracelular y disminuye así su toxicidad para las células presentes en los cultivos (92).

Por otro lado, hay que tener en consideración que la administración de GH a ratas viejas incrementa la expresión de IGF-I en el cerebro (29), incluyendo el hipocampo (28), y sus niveles circulantes en sangre (93). Numerosos estudios han demostrado que el IGF-I revierte la disminución de receptores tipo NMDA asociada al envejecimiento y en particular el de sus subtipos NMDAR2a y NMDAR2b (94) e incrementa la función del receptor D2 mejorando tanto la memoria espacial como la de trabajo (95). Un estudio de Lynch y cols. (96) en el que analizan la utilización de glucosa por el cerebro tras la administración de IGF-I, muestra como este aumenta su tasa de utilización en determinadas regiones cerebrales. Por lo tanto, se puede decir que el IGF-I ayuda a evitar la disminución de la función glutamatergica en el cerebro senescente (96). En resumen, de todos los estudios previamente citados, podemos deducir que el IGF-I, junto con otros factores neurotróficos, juega un papel fundamental en la prevención del envejecimiento cerebral.

Dado que el IGF-I es un reconocido factor neuroprotector para las neuronas hilares (97, 98), es lógico suponer que el incremento de su producción local puede mediar efectos neuroprotectores de la GH. Se debe considerar la posibilidad de que la GH ejerza su neuroprotección de forma indirecta a través del incremento de IGF-I. De los datos de Carson et al (99) y Beck et al (100) se deduce que número y tamaño neuronal dependen de los niveles de IGF-I. Más concretamente, Trejo y cols. (101,102) aportan datos de observaciones recientes en los que ratones deficientes en IGF-I presentan una reducción en el número de neuronas. Asimismo, estos autores sugieren que la supervivencia neuronal parece depender de la kinasa sérica Akt, molécula relacionada con la vía de supervivencia neuronal estimulada por IGF-I (103). Por lo tanto, el restablecimiento con GH de los niveles de IGF-I disminuidos con el envejecimiento es capaz de generar neuroprotección (104,105,106, 107). Esto mismo ocurre en el hígado donde tras observarse una disminución de IGF 1 en los hepatocitos con la edad, se puede ver que viene acompañado de un aumento del estrés oxidativo. Esto se traduce en un incremento significativo de la peroxidacion lipídica (LPO), del oxido nitrico (NO), del monoxido de carbono (CO) y del guanosilmonofosfato cíclico (cGMP), con una disminución significativa del adenosil trifosfato (ATP). La administración de GH restablece los niveles de IGF 1 hasta conseguir alcanzar los de animales jóvenes por lo que la administración de GH ejerce efectos beneficiosos contra los cambios relacionados con la edad (108).

De cualquier forma el efecto mas importante observado tras la administración de la GH, consiste en la inhibición de la apoptosis en los cerebros de los animales viejos. Tanto en machos como en hembras castradas e intactas, se observa un

claro descenso en el número de nucleosomas, es decir, un descenso en el grado de apoptosis que se produce en el homogenado de cerebro total. De la misma forma, se aprecia como los niveles de Bcl-2 se incrementan de forma muy marcada en todos los animales que reciben el tratamiento con GH. Este incremento puede deberse a la puesta en marchas de varias vías de señalización intracelulares que pueden activarse por la GH directamente o a través del IGF-I, cuyos niveles tanto plasmáticos como de expresión en SNC aumentan tras la administración de GH sistémica (28). Resulta muy complejo evidenciar qué efectos tienen lugar por acción directa de la GH y cuáles están mediados por el IGF-I.

Se sabe desde hace tiempo que la principal vía por la que el IGF-I inhibe la apoptosis es a través de la PI3-quinasa, que a su vez fosforila a la Akt/proteína quinasa B (Akt/PKB) (28, 109, 110). La activación de esta vía tiene lugar tanto a través de IGF-I como a través de GH (28) y da lugar a tres fenómenos. Por un lado se fosforila Bad (111), y dado que en su forma fosforilada no es capaz de unirse a las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, deja a esta última libre y capaz de ejercer sus efectos, bloqueando la inducción de la apoptosis. Este podría ser el responsable de que por un lado exista un descenso en los procesos apotóticos en nuestro homogenado cerebral como así lo reflejan los niveles de nucleosomas, y que por otro lado aumenten los niveles de Bcl-2, dado que al disminuir los niveles de Bad capaz de unirse a él, va a existir mayor cantidad de Bcl-2 libre capaz de ejercer sus efectos antiapotóticos. Asimismo, se sabe que Akt/PKB es capaz de activar al factor de transcripción CREB (112) y éste a su vez estimula la expresión de Bcl-2 (113). Por lo tanto, a través de la activación de Akt/PKB por parte del IGF-I se produce un aumento en los niveles de Bcl-2. Este podría ser uno de los mecanismos por los que aumentan los niveles de Bcl-2 en los cerebros de nuestras ratas viejas tratadas con GH. El otro fenómeno que tiene lugar como consecuencia de la fosforilación de PI3-quinasa y Akt/PKB es la inhibición de la caspasa-9. Hay que señalar a este respecto que la propia Bcl-2 es, a su vez, responsable de los niveles bajos de caspasa-9, dado que al ejercer sus efectos anti-apoptóticos y proteger la integridad de la membrana mitocondrial no permite la salida al citosol del citocromo C, con lo que bloquea la activación de la caspasa 9 iniciadora de la apoptosis.

En nuestro estudio obtenemos resultados que concuerdan con este hecho, dado que en el grupo de hembras intactas tratadas con GH podemos apreciar como en el hipocampo la expresión de caspasa-9 tanto activa como inactiva está claramente disminuida en comparación con los de las hembras de su misma edad que no reciben tratamiento alguno. El descenso igualmente evidente de los niveles de las isoformas activa e inactiva de la caspasa-3 en el hipotálamo, podría

deberse probablemente al hecho de que al estar disminuidos los niveles de caspasa-9 no se produce el reclutamiento de la caspasa-3 para llevar a cabo los fenómenos de apoptosis en la neurona.

Hay que mencionar también como mecanismo de inhibición de apoptosis la activación de las MAPKs, por GH que dan lugar a la activación de CREB y también estimula la expresión de Bcl-2 (110). Ambos mecanismos explicarían el aumento de Bcl-2 en los animales de este estudio que son tratados con GH. Por otro lado, existen evidencias en la literatura de que Bad puede llegar a fosforilarse, o por lo menos a estabilizarse en su forma fosforilada, a través de la activación de MAPK (114), lo que también impediría que ejerza sus efectos pro-apoptóticos.

Por último, hay otro mecanismo que permite la inhibición de la apoptosis a través de la acción del IGF-I, que implica la activación de Raf-1 y su posterior translocación a la mitocondria (109), lo que daría lugar a la fosforilación de Bad en colaboración con la Bcl-2 (115, 116).

Desde otro punto de vista a nivel del hipocampo se produce con la edad un incremento de los indicadores de inflamación como son un aumento de TNF alfa y de IL 6 así como de NFkB. Este incremento, también observado en el envejecimiento de otros tejidos como el hígado (117, 118, 119) disminuye de forma significativa tras el tratamiento con GH (Figs. 3 A y B).

La primera vez que se documentó la interacción de las vías de señalización de IGF-I y estradiol a nivel cerebral fue en 1988 (120) en cultivos primarios de hipotálamos de ratas fetales. Asimismo, se ha comprobado que los receptores de IGF-I y de estradiol cooperan para estimular el crecimiento dendrítico en cultivos primarios de hipotálamo de ratas (121) y en la inducción de plasticidad sináptica en el hipotálamo de ratas hembras adultas (122). Por otra parte, se ha visto una co-localización muy extensa de receptores estrogénicos y de IGF-I en el cerebro de la rata adulta (123). Es más, los receptores de IGF-I se co-localizan con ambas isoformas α y β de los ERs. Esta abundante coexpresión de los receptores estrogénicos y del IGF-I sugiere que pueda existir interacción de sus vías de señalización en varias regiones del SNC.

Evidencias experimentales de la interacción que ocurre entre el IGF-I y los estrógenos se encuentran en numerosos estudios *in vitro* en los que cultivos celulares neuronales son expuestos a agentes que o bien inhiben la síntesis de IGF-I o las vías de señalización de la PI3K y las MAPK o incluso son incubados con antagonistas del receptor estrogénico (121, 124). La conclusión es que la activación coordinada, por parte de ambas sustancias de las vías de señalización, es necesaria para la supervivencia neuronal.

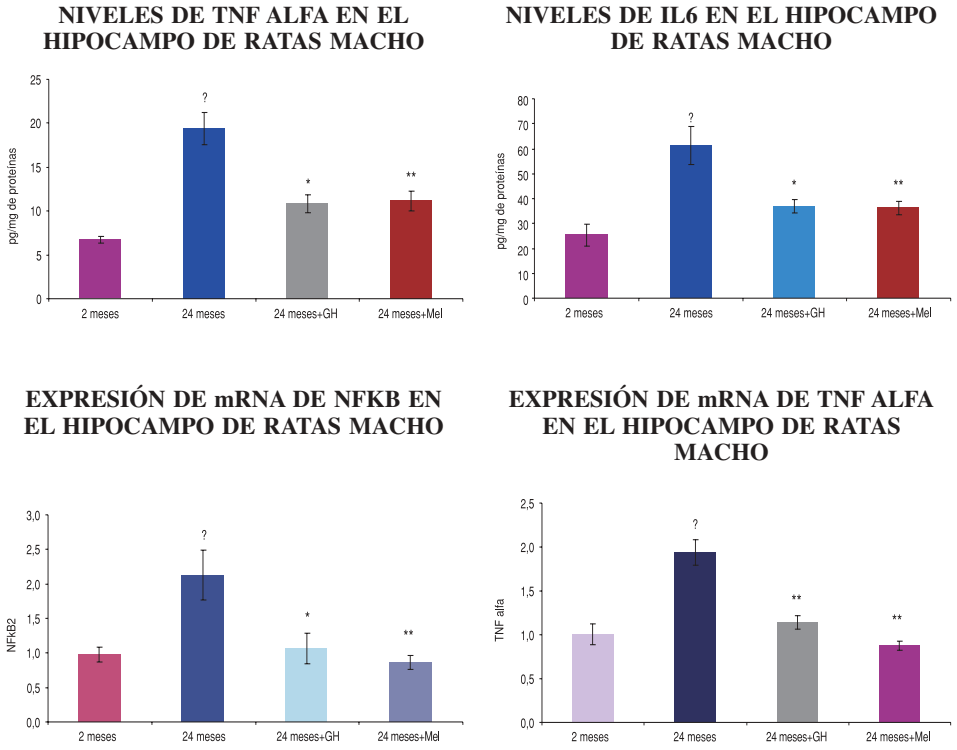


FIGURA 3. *Efecto de la GH y la melatonina sobre marcadores de inflamación en el hipocampo. En todos los casos hay un incremento significativo con la edad que disminuye marcadamente tras ambos tratamientos.*

Si tenemos en cuenta que el estradiol aumenta los niveles locales de IGF-I que a su vez activan a sus propios receptores, se va a producir un incremento de la neuroprotección. Otras moléculas que podrían estar involucradas en la convergencia de las acciones del IGF-I y del estradiol son las de las proteínas de la familia de las Bcl-2, dado que ambas sustancias son capaces de inducir la expresión de dicha proteína anti-apoptótica en el cerebro de la rata adulta (125;126, 127, 128).

Un hecho particularmente interesante con respecto a la interacción del IGF-I y el estradiol es la localización de los ERs involucrados en la neuroprotección. Los receptores para IGF-I se detectan en el hilus del giro dentado y disminuye su número tras la provocación de lesiones como la que produce el ácido kaínico (129). Por el contrario, ni los ERα ni ERβ se expresan

en las neuronas hilares. Se cree por lo tanto, que los efectos neuroprotectores de los estrógenos estén mediados por los efectos transinápticos de neuronas que se proyectan hacia el hilus. Se ha demostrado co-localización de receptores de IGF-I y ERβ en astrocitos presentes en el hilus, sugiriendo que probablemente las células de la glia tendrían un papel en la coordinación de las acciones de estas dos sustancias para llevar a cabo sus efectos neuroprotectores.

Como se menciona al inicio de este apartado, se ha realizado también un estudio de la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo en los tres grupos de animales. Tras el recuento de células BrdU(+) en los animales tratados con GH se aprecia que no hay modificación alguna en comparación con los animales controles. Es decir, ni en machos ni en hembras intactas o castradas la GH es capaz de estimular la neuronogénesis. Estos datos no concuerdan con los datos presentes en la bibliografía disponible. Dos de los estudios más significativos (130, 131) han demostrado en los últimos años que la administración tanto intracerebroventricular como periférica de IGF-I aumenta la neuronogénesis en ratas adultas y viejas respectivamente. Ante esta aparente contradicción con nuestros resultados hay que matizar dos cuestiones: por un lado la vía de administración de la IGF-I y por otro la duración del tratamiento. Los animales del estudio de Aberg (130), tienen una edad mucho menor que los nuestros (4 meses) y la duración del tratamiento con este factor, es de sólo 20 días en el mayor de los casos. El estudio de Lichtenwalner *et al*. (131), utiliza animales de 28 meses pero la vía de administración es completamente diferente al realizarse de forma intracerebroventricular y por lo tanto alcanzarse concentraciones de IGF-I muchísimo más elevadas que las que podemos conseguir nosotros mediante la administración periférica de GH. Por otro lado, este tratamiento dura también en el mayor de los casos 42 días. Por lo tanto, en estos experimentos se ha estudiado los efectos de tratamientos mas agudos mientras que nosotros lo hemos hecho en un tratamiento crónico y cuasi fisiológico administrado durante 10 semanas, tiempo durante el que han podido producirse fenómenos que impidan a la GH y al IGF-I ejercer sus efectos promotores de la neuronogénesis hipocampal.

Este fenómeno sugiere un posible efecto inhibidor de la GH sobre la neurogénesis cuando se administra de forma crónica, inhibición que incluso llega a imponerse sobre el comprobado efecto inductor del estradiol, cuando ambos se administran conjuntamente. Posiblemente nos encontremos de nuevo frente a un entrecruzamiento de vías de señalización de IGF-I y estrógenos que consigue anular los efectos de estos últimos.

En el presente trabajo se ha estudiado asimismo el efecto que tiene la administración de GH sobre la expresión de dos de las enzimas implicadas en la protección antioxidante celular: Mn-SOD y GPx. En las hembras castradas los niveles de Mn-SOD permanecen inalterados, conservando por lo tanto niveles parecidos a los de las hembras de su misma edad intactas y, en consecuencia, también a los de las hembras jóvenes de 2 meses. Es decir, la expresión de Mn-SOD en nuestro estudio no se ve afectada ni por el proceso de envejecimiento ni por la presencia o ausencia de estrógenos endógenos.

El caso de la GPx es diferente: por un lado, se observa como en las hembras de 24 meses castradas se produce un significativo descenso en su expresión. Por otro lado, tras el tratamiento con GH los niveles de expresión de GPx aumentan hasta cerca de 4 veces más que en las hembras castradas no tratadas. Estos dos hechos podrían significar que por un lado, el envejecimiento en ausencia de estrógenos endógenos implica un evidente descenso en la expresión de la enzima antioxidante GPx y que, por otro, el tratamiento con GH es capaz de estimular la expresión de esta enzima hasta valores próximos a los de las hembras intactas jóvenes de 2 meses. Posiblemente la importancia biológica de este hallazgo radique en que el incremento de GPx tras la administración de GH pueda ser considerada uno de los mecanismos implicados en la conservación del número total de neuronas observado en nuestro estudio.

Existen datos en la bibliografía que respaldan los efectos generados por la administración de GH en relación con las defensas antioxidantes. GH e IGF-1 han demostrado ser capaces de reducir el estrés oxidativo y mejorar las defensas antioxidantes en diversos modelos experimentales en los que el daño oxidativo está implicado, como la cirrosis hepática inducida por CCl4 (132) o el daño térmico (133). En estos modelos y en otros de envejecimiento hepático investigados por nuestro grupo (108), la administración de GH o IGF-1 es capaz de reducir la peroxidación lipídica, mantiene los niveles de GSH, aumenta la actividad de enzimas antioxidantes, mejora la función mitocondrial aumenta la producción de ATP y preserva la función hepática. Por otra parte, se ha demostrado que la disminución en la expresión de algunos genes relacionados con el metabolismo intermediario y de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial inducida por la edad puede ser revertida con la administración de GH (134).

En resumen, la mejoría de uno de los mecanismos antioxidantes de los que disponen las células como es la GPx, parece señalar que la administración de GH podría ejercer un efecto beneficioso sobre el daño oxidativo restableciendo las defensas antioxidantes disminuidas con el envejecimiento. Sin embargo, existe una gran controversia en referencia a la posible relación entre envejecimiento, estrés

oxidativo y GH. Varios estudios han mostrado un incremento del estrés oxidativo y una reducción de las defensas antioxidantes y de la expectativa de vida en ratones transgénicos que sobreexpresan GH, mientras que aquellos que carecen de GH, IGF-1 o de sus efectos (135, 136, 137, 138) presentan el efecto contrario. Todos estos datos no son concluyentes, ya que los resultados presentados no muestran un claro patrón de exceso de estrés oxidativo inducido por las hormonas del eje somatotropo (136, 137). De hecho, otros trabajos llevados a cabo en ratones knock-out para el receptor de GH, un modelo de "déficit aislado" de GH, no han sido capaces de demostrar que la mayor expectativa de vida de estos animales se deba a una mayor actividad de enzimas antioxidantes y un menor daño oxidativo; es más, estos animales presentan algunos indicios de mayor daño oxidativo que los ratones normales (139). Algunas de las discrepancias respecto de los efectos beneficiosos o dañinos de la GH sobre el envejecimiento pueden estar relacionadas con el diferente efecto de esta hormona en función de la dosis administrada o los niveles plasmáticos alcanzados: cantidades fisiológicas pueden ejercer efectos beneficiosos (69, 108, 117, 140, 141), mientras que un exceso patológico puede conducir a una situación de enfermedad y envejecimiento acelerado (,135,138, 142,143,) como ocurre en la acromegalia. Y, por último, no se debe olvidar que algunos de estos modelos animales han sido manipulados genéticamente, lo cual puede estar introduciendo algún sesgo en los resultados obtenidos. Con el régimen empleado en el presente estudio en el que se ha intentado restablecer niveles fisiológicos , no solo no se ha detectado un incremento de la morbi-mortalidad respecto de los animales no tratados , sino una mejoría evidente de la función no solo cerebral sino también de muchos otros parámetros fisiológicos.

Se han analizado también resultados relativos a la expresión de la Sir2 en el cerebro de dos subpoblaciones de hembras viejas intactas y ovariectomizadas. En las primeras la expresión de Sir2 permanece similar a la de las hembras de 2 meses y el tratamiento con GH no produce modificación alguna sobre su grado de expresión. Sin embargo, en el caso de las hembras viejas castradas apreciamos como la expresión de Sir2 disminuye de forma muy marcada en comparación con las hembras intactas de su misma edad . Nuevamente, por tanto, nos encontramos frente a un caso de "desprotección" en las hembras que carecen de estrógenos endógenos. En estas hembras el tratamiento con GH sí produce un aumento muy significativo de la expresión de Sir2. Estos hallazgos conducen a realizar diversas consideraciones: por un lado, que el envejecimiento produce un descenso en la expresión de Sir2 sólo en las hembras que presentan una depleción crónica de estrógenos endógenos y no en las hembras viejas intactas. Por otro lado, el tratamiento de GH aún en ausencia de estrógenos endógenos es capaz de revertir los valores de expresión de Sir2 prácticamente a

valores similares a los de las hembras intactas, y en consecuencia a los de las hembras jóvenes de 2 meses. De cualquier forma, no existen datos previos en la literatura a este respecto.

Hay que resaltar que estos resultados pueden posiblemente esclarecer otro de los mecanismos a través de los que actúa la GH para permitir una mayor supervivencia del número total de neuronas hilares que observamos en nuestros animales. Es decir, el aumento de la expresión de la Sir2 generado por el tratamiento con GH podría estar directamente relacionado con la conservación de la población de neuronas hilares que se aprecia en nuestro estudio. Como ya comentamos en la introducción, existen varios hallazgos que sugieren la posibilidad de que Sir2 incremente la capacidad para detoxificar especies reactivas de oxígeno, consiguiendo aumentar la resistencia al daño oxidativo y que este se atenúe en consecuencia (144). En la misma línea, varios autores (145, 146, 147) demuestran que la activación de Sir-2 ejerce un efecto neuroprotector. De hecho, en uno de estos estudios (148) se ha conseguido demostrar como la SIRT1 es capaz de proteger a las neuronas de la apoptosis inducida por la proteína p53. Por todo ello, no sería de extrañar que este fuera un mecanismo importante de neuroprotección en las neuronas hilares.

En conclusión, nuestros hallazgos muestran como el tratamiento de GH ejerce un claro efecto neuroprotector a través de la inhibición de la apoptosis en el tejido del SNC estudiado y los mecanismos antiapoptóticos que desencadena pueden implicar a varias vías de señalización intracelular como la de la PI-3-quinasa-Akt/PKB, la de la activación de la MAPK o la de la traslocación mitocondrial de Raf1. Todas ellas se encuentran relacionadas y van a tener como consecuencia última la modificación de los niveles de las moléculas implicadas en la cascada de la apoptosis, ya sea disminuyendo la expresión de las caspasas o aumentando los niveles de las proteínas de la familia Bcl-2 anti-apoptóticas y disminuyendo los de las pro-apoptóticas. También puede observarse una disminución de los indicadores de estrés oxidativo como es el caso de LPO, iNOS o de aumento de los antioxidantes como Sir 2 y de la inflamación reflejada en valores de citoquinas o TNFα.

Efecto del tratamiento con Melatonina sobre el SNC

Ya se ha descrito anteriormente como ciertos parámetros del SNC de los animales viejos de 24 meses. evolucionan de forma negativa con el envejecimiento. Se ha visto como el número de neuronas hilares del hipocampo de las ratas

machos de 24 meses era significativamente menor que el de las ratas más jóvenes de 22 meses. Se han evaluado los efectos del tratamiento crónico con melatonina sobre este parámetro y no se produce modificación alguna tras las 10 semanas de tratamiento. Es decir, la melatonina no es capaz de mantener el número de neuronas hilares en valores similares a los presentados por animales más jóvenes, permaneciendo prácticamente iguales a los de los machos de su misma edad que no han sido tratados. Sin embargo al analizar las células BrdU(+) reflejo de la neuronogénesis en el hipocampo de los animales de experimentación, se observa que el tratamiento con melatonina aumenta considerablemente y de forma estadísticamente significativa la proliferación celular (Fig. 4A).

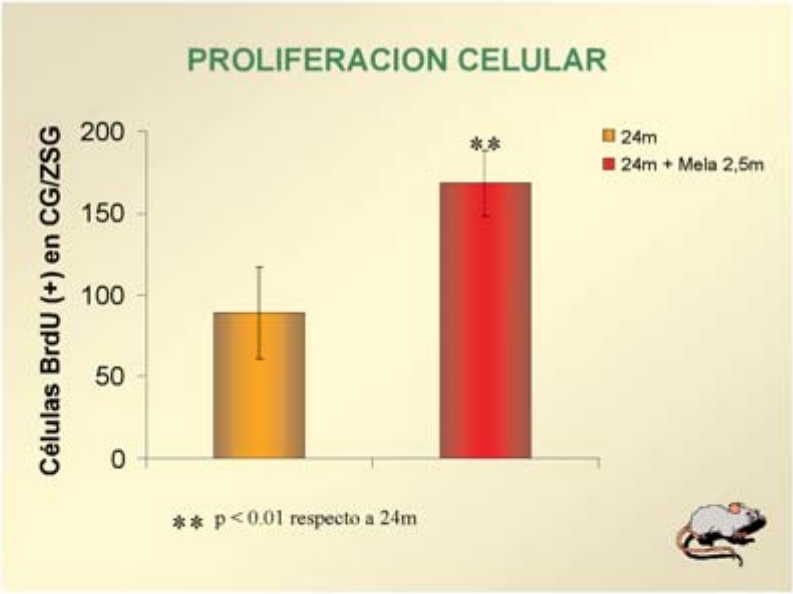
Se pudo comprobar igualmente como con el paso del tiempo aumenta el número de nucleosomas hasta alcanzar valores máximos a los 24 meses. En el caso de los animales tratados con melatonina, observamos como el tratamiento es capaz de reconducir los niveles a valores significativamente menores que los de los machos de 24 m. que no han sido tratados, queriendo esto decir, que la melatonina de alguna forma disminuye la apoptosis en el hipocampo.

La proteína anti-apoptótica Bcl-2 en estos mismos homogenados cerebrales disminuyen con la edad hasta alcanzar valores mínimos en los animales de 24 meses. Tras el tratamiento crónico con melatonina, sorprendentemente, no se aprecia un incremento en los niveles de esta proteína Sin embargo este hecho no resulta contradictorio con el descenso en los niveles de nucleosomas, dado que la apoptosis no tiene por qué deberse obligatoriamente a un aumento de la protección frente a la apoptosis por parte de la proteína Bcl-2. Sin embargo si que disminuyen los indicadores de inflamación en el hipocampo (Figs. 3 A B) de la misma forma que con GH y en forma similar a la observada en otros tejidos (80, 81, 141).

En conclusión, los efectos neuroprotectores observados por el tratamiento con melatonina en los SNC de nuestras ratas machos de 24 meses se resumen en un aumento significativo de la neuronogénesis y un descenso en los fenómenos de apoptosis a pesar de no producirse a través del incremento de proteína anti-apoptótica Bcl-2, una disminución del estrés oxidativo y un descenso de la inflamación (Figs. 3 A y B).

Hasta hace poco tiempo, el único efecto que se conocía de la melatonina sobre la proliferación celular provenía de estudios en líneas celulares de cáncer de mama, en los que la melatonina actuaba de forma directa suprimiendo su proliferación (149). Sin embargo estudios recientes han demostrado esto no es siempre así. Danilova y cols. (150) demuestran que la melatonina estimula la proliferación celular en el embrión del pez cebra, y que el mecanismo responsable

A



B

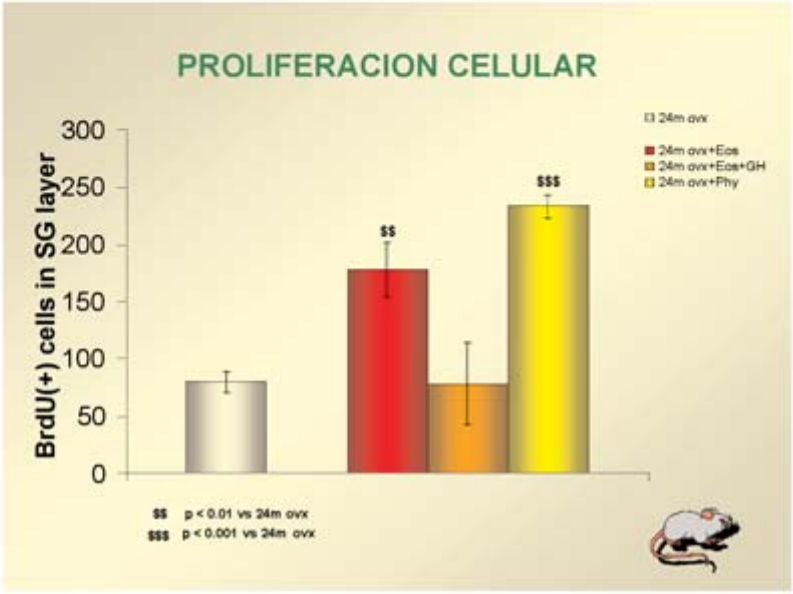


FIGURA 4. *Efecto del tratamiento con Melatonina sobre la proliferación celular en el hipocampo (A). Efecto similar de los estrógenos y Fitoestrógenos (B).*

actúa a través de receptores específicos para la misma. De hecho, estudios previos que aportan datos muy prometedores como promotora de la proliferación celular (151, 152), sugieren la implicación directa del receptor MT2, teniendo en cuenta que los esplenocitos de ratones knock-out para el receptor MT1, consiguen proliferar en respuesta a su administracion. Por lo tanto, es muy probable que el efecto estimulador de la melatonina sobre la proliferación celular, dependerá del tipo de receptor que predomina en el tejido en cuestión: es decir, la relación MT1/MT2 en un tejido. Esto determinaría su grado de proliferación celular en respuesta al tratamiento. Se ha descrito también otro posible mecanismo de estimulación de la proliferación celular. Si el efecto celular predominante tras la activación de los receptores MT, es el descenso de los niveles de AMPc, y éste por otra parte, es un conocido intermediario de la regulación del ciclo y la proliferación celular, todo ello sugiere la posible implicación de la vía del AMPc en la estimulación de la proliferación melatonina dependiente (150, 153). Por último, existe un reciente trabajo publicado por Kim y cols. (154) en el que se estudia el efecto de la melatonina en el giro dentado del hipocampo de ratas que han sido separadas de sus madres antes del destete. Es capaz de estimular de forma evidente y significativa la proliferación neuronal en el giro dentado de los animales tratados.

Con respecto a los efectos sobre la apoptosis, nuestros datos resultan concordantes con los hallazgos de otros autores. De hecho, en el estudio de Osborne y cols. (155) realizado en células pigmentarias epiteliales de la retina, la melatonina es capaz de reducir de forma significativa la apoptosis sin evidenciarse valores elevados de Bcl-2. Por lo tanto, una de las posibilidades que se nos plantean es la de que la inhibición de la apoptosis o bien no se realice a nivel de la vía mitocondrial y se haga a nivel de la vía de activación de los receptores de muerte o bien que, aún llevándose a cabo a nivel de la vía mitocondrial, no necesite de la participación de las proteínas Bcl-2. Si la actuación de la melatonina se realiza a nivel de la vía extrínseca, es decir, la vía de activación de los receptores de muerte, esta sustancia podría intervenir a cualquier nivel de dicha vía de activación.

Esta ruta se inicia con la participación de la caspasa-8 que, tras ser reclutada por los receptores de muerte una vez activados por la unión a su ligando, activa a la pro-caspasa-3 que se convierte en caspasa-3 y es la molécula que finalmente ejecuta el programa de muerte celular. Se podría por lo tanto especular que la acción de la melatonina se lleva a cabo a cualquiera de estos niveles, ya sea a nivel de la unión de los receptores de muerte con sus ligandos, que son moléculas estructuralmente relacionadas que pertenecen a la superfamilia del

factor de necrosis tumoral (TNF); o bien a nivel de cualquiera de los pasos intermedios entre la formación de la caspasa-8 y la ejecución por parte de la caspasa-3. Hemos visto nosotros como disminuyen precisamente los niveles de TNFα en distintos tejidos de los animales tratados con melatonina (80,117). Por otro lado, la melatonina podría actuar directamente sobre la vía mitocondrial que, a groso modo, se basa en la liberación del citocromo C por parte de la mitocondria tras haber sufrido algún tipo de daño o desgaste (como el daño oxidativo por la exposición a radiaciones ionizantes o a toxinas), que posteriormente activa a la caspasa-9 que termina activando a su vez a la caspasa-3, que finalmente ejecuta la muerte celular. Es por lo tanto muy posible, como hemos podido comprobar que una posible intervención de la melatonina, como potente antioxidante endógeno, es evitar la liberacion del citocromo C por la mitocondria para impedir el proceso de apoptosis(140 y 141)protegiendo así frente al estrés oxidativo tan elevado que presentan las mitocondrias del tejido cerebral de animales tan viejos. Esta opción ha sido también sugerida por Sainz y cols. (156), que apunta a que la capacidad protectora anti-apoptótica de la melatonina se debe a su actuación no sólo como antioxidante directo o indirecto de los radicales libres presentes en el interior de la célula, sino también como activador del complejo mitocondrial I y IV. Asimismo, el grupo de Acuña et al (157, 158) han observado efectos similares.

En cualquier caso parece lógico pensar que el principal mecanismo antiapoptótico que la melatonina utiliza en el caso de los cerebros senescentes, esté basado en sus propiedades antioxidantes. De hecho, el SNC es un órgano especialmente vulnerable a la acción de los radicales libres y los cerebros de estos animales tan viejos, están expuestos a ellos en mayor medida que en animales más jóvenes. Esta especial y elevada vulnerabilidad del SNC se debe a varios factores como el elevado consumo de oxígeno que en él tiene lugar; el abundante tejido lipídico que contiene, constituido en su mayor parte por ácidos grasos poliinsaturados; la elevada proporción de superficie ocupada por membranas celulares en comparación con el citoplasma; la morfología axonal que resulta más proclive a las lesiones oxidativas; y en particular, la escasa capacidad antioxidante endógena del propio cerebro habida cuenta de la situación de riesgo oxidativo tan pronunciada en la que se encuentra.

A pesar de esto, el SNC cuenta con una batería de sistemas de defensa celular para contrarrestar las acciones deletéreas de los radicales libres de oxígeno. Hay antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos capaces de disminuir la concentración de radicales libres y reparar el daño celular oxidativo provocado. En el cerebro encontramos enzimas como la catalasa, la peroxidasa o la superóxido dismutasa; an-

tioxidantes de bajo peso molecular como los carotenoides o el ácido ascórbico; y, por último, agentes quelantes directos de radicales libres que funcionan como protectores biológicos específicos de moléculas esenciales, capaces de neutralizar las especies reactivas (159). Por su parte la melatonina presenta ciertas características biológicas que la convierten en una sustancia particularmente apropiada para el desempeño de tareas neuroprotectoras en el cerebro. De hecho se trata de una sustancia tanto hidrofílica como lipofílica, capaz por tanto de atravesar todo tipo de barreras morfofisiológicas y de entrar en células y compartimentos subcelulares sin problema alguno. Por lo tanto, se trata de una sustancia capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y penetrar de forma sencilla hasta compartimentos celulares fundamentales para la funcionalidad de la neurona como pueden ser las mitocondrias o el núcleo. Fue Ianas (75) el primero en sugerir que la melatonina pudiera ser una sustancia quelante de radicales libres, es decir, una molécula con propiedades antioxidantes directas sobre diversos radicales libres tales como el radical peroxilo, el radical hidroxilo o su precursor, el peróxido de hidrógeno. La melatonina presenta otra característica que le confiere una particular utilidad como antioxidante, y es la de ser capaz de generar la denominada cascada antioxidante, por la que los intermediarios de las reacciones de neutralización de la melatonina, son a su vez potentes antioxidantes capaces de neutralizar a su vez más radicales. No hay que olvidar, por otra parte, el fundamental papel que desempeña la melatonina en la estimulación de la actividad de varias enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa o la glutatión reductasa (159).

Con respecto a este último aspecto hay que señalar que uno de los parámetros estudiados ha sido la expresión en cerebro de dos enzimas antioxidantes: Mn-SOD y GPx. Las mediciones se han llevado a cabo en hembras intactas de 2 y 24 meses., en hembras castradas de 24 meses y en hembras castradas e intactas de 24 meses tratadas con melatonina. En las hembras intactas, no se aprecian diferencias en la expresión de Mn-SOD ni de GPx en las hembras de 24 meses. con respecto a las hembras jóvenes de 2 meses Es decir, el envejecimiento no es capaz de modifica la expresión de ninguna de estas dos enzimas antioxidantes en el caso de las hembras intactas. El tratamiento con melatonina en estos animales tampoco ejerce efecto alguno, y la expresión de GPx y Mn-SOD no se altera. En las hembras castradas de 24 meses., la expresión de Mn-SOD es casi idéntica a la de las hembras de su misma edad que permanecen intactas. El tratamiento con melatonina tampoco modifica la expresión de la Mn-SOD en las hembras viejas castradas. O sea, que la expresión de Mn-SOD no disminuye ni por la edad ni por la castración y, por otro lado, que el tratamiento con melatonina no altera su expresión. Sin embargo la expresión de GPx en las hembras de 24 meses sí disminuye de forma drástica tras la castra-

ción en comparación con las hembras intactas. El tratamiento con melatonina en las hembras castradas, no ejerce efecto alguno sobre su expresión, manteniéndose los mismos niveles que en las hembras castradas no tratadas. Todo esto lo que sugiere es que las hembras intactas son capaces de conservar el nivel de expresión de GPx, mientras que en las hembras castradas disminuye. La melatonina, a pesar de tener la capacidad de estimular la expresión y actividad de un gran número de enzimas antioxidantes (entre las que la bibliografía demuestra que se encuentra la GPx), no consigue activar la expresión de la GPx en los homogenados cerebrales de la hembras castradas de 24 meses. Esto hace pensar en una posible implicación de los estrógenos endógenos, sin los cuales los niveles de GPx no consiguen mantenerse en las hembras castradas y terminan cayendo, y sin los que la melatonina no es capaz de estimular de forma efectiva la expresión de esta misma enzima.

Habíamos tambien visto anteriormente que a nivel del hipocampo se produce con la edad un incremento de los indicadores de inflamación como son un aumento de TNF alfa y de IL 6 así como de NFkB. Este incremento, también había sido observado en el envejecimiento de otros tejidos como el hígado (117,118,119). El tratamiento con melatonina disminuye de forma significativa todos estos parámetros (Fig 3 A y B).

CONCLUSIONES

De los datos anteriormente mencionados se deduce que la mayoría de las alteraciones que aparecen a nivel cerebral con el paso del tiempo, ocurren en función del incremento del estrés oxidativo y de la inflamación.

La disminución de GH y melatonina que ocurren con el envejecimiento pueden ser al menos parcialmente responsables de dichas alteraciones ya que tienen un papel antiinflamatorio y antioxidante bien establecido. De esta forma su administración exógena a niveles fisiológicos, como tratamiento de sustitución terapéutica, es capaz de revertir al menos en parte algunas de las alteraciones observadas.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Keuker, J.I., Luiten, P.G., Fuchs E. 2003. Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. Neurobiology of Aging. v. 24, p. 157-165.

(2) Long, J.M., Mouton, P.R., Jucker, M., Ingram, D.K. 1999. What counts in brain aging? Design-based stereological analysis of cell number. J. Gerontol. A Biol Sci. Med. Sci., v. 54, p. B407-417.

(3) Merrill, D.A., Chiba, A.A., Tuszynski, M.H. 2001. Conservation of neuronal number and size in the enthorinal cortex of behaviorally characterized aged rats: J. Comp Neurol., v. 438, p. 445-456.

(4) West, M.J., Slomianka, L., Gundersen H.J. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in thesubdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. Anat. Rec., v. 231, p. 482-497.

(5) Shetty, A.K., Turner, D.A. 1999. Vulnerability of the dentate gyrus to aging and intracerebroventricular administration of kainic acid. Exp. Neurol, 158: 491-503.

(6) Geinisman, Y., Ganeshina, O., Yoshida, R., Berry, R.W., Disterhoft, J.F., Gallagher, M. Aging, spatial learning, and total synapse number in the rat CA1 stratum radiatum. Neurobiol Aging. 2004; 25(3): 407-16.

(7) Nyberg, F. 2000. G.H. in the Brain: Characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. Frontiers in Neuroendocrinology, 21: 330-348 .

(8) Bjork, S., Jonsson, B., Westphal, O., Levin, J.E. 1989. Quality of life of adults with growth hormone deficiency: a controlled study. Acta Paediatr Scand Suppl., 356: 55-59.

(9) Hayashi, M., Shimohira, M., Saisho, S., Shimozawa, K., Iwakawa, Y. 1992. Sleep disturbance in children with growth hormone deficiency. Brain Dev., 14: 170-174.

(10) Rosen, T., Eden, S., Larson, G., Wilhelmsen, L., Bengtsson, B.A. Cardiovascular risk factors in adult patients with growth hormone deficiency. Acta Endocrinol (Copenh). 1993; 129: 195-200.

(11) Bengtsson, B.A., Eden, S., Lonn, L., Kvist, H., Stokland, A., Lindstedt, G., Bosaeus, I., Tolli, J., Sjostrom, L., Isaksson, O.G. 1993. Treatment of adults with growth hormone (GH) deficiency with recombinant human GH. J Clin Endocrinol Metab., 76: 309-317.

(12) Burman, P., Broman, J.E., Hetta, J., Wiklund, I., Ehrfurt, E.M., Hagg, E., Karlsson, F.A. 1995. Quality of life in adults with GH deficiency. Responses to treatment with rh GH in a placebo controlled 21 months trial. J. Clin. Endocrinol. Metab., 80: 3585-3590.

(13) Burman, P., Deijen, J.B. 1998. Quality of life and cognitive function in patients with pituitary insufficiency. Psychother Psychosom., 67: 154-167.

(14) Deijen, J.B., de Boer, H., van der Veen, E.A. 1998. Cognitive changes during growth hormone replacement in adult men. Psychoneuroendocrinology, 23: 45-55.

(15) Gibney, J., Wallace, J.D., Spinks, T., Schnorr, L., Ranicar, A., Cuneo, R.C., Lockhart, S., Burnand, K.G., Salomon, F., Sonksen, P.H., Russell-Jones, D. 1999. The effects of 10 years of recombinant human growth hormone (GH) in adult GH-deficient patients. J. Clin Endocrinol Metab., 84: 2596-2602.

(16) Gustafson, K., Hagberg, H., Bengtsson, B.A., Brantsing, C., Isgaard, J. 1999. Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in neonatal rats. Pediatr Res., 45: 318-323. .

(17) Nyberg, F., Sharma, H.S. 2002. Repeated topical application of growth hormone attenuates blood-spinal cord barrier permeability and edema formation following spinal cord injury: an experimental study in the rat using Evans blue, ([125]) I-sodium and lanthanum tracers. Amino Acids, 23: 231-239.

(18) Scheepens, A., Williams, C.E., Breier, B.H., Guan, J., Gluckman, P.D. 2000. A role for the somatotropic axis in neural development, injury and disease. J. Pediatr Endocrinol Metab., 13 Suppl 6: 1483-1491.

(19) Scheepens, A., Sirimanne, E.S., Breier, B.H., Clark, R.G., Gluckman, P.D., Williams, CE. 2001. Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. Neuroscience, 104: 677-687.

(20) Lamberts, S.W., van den Beld, A.W., van der Lely, A.J. 1997. The endocrinology of aging. Science, 278: 419-424.

(21) Erickson, C.A., Barnes, C.A. 2003. The neurobiology of memory changes in normal aging. Exp Gerontol., 38: 61-69.

(22) Gallagher, M., Bizon, J.L., Hoyt, E.C., Helm, K.A., Lund, P.K. 2003. Effects of aging on the hippocampal formation in a naturally occurring animal model of mild cognitive impairment. Exp Gerontol., 38: 71-77.

(23) Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. Prog Neurobiol., 69: 143-179.

(24) Burgess, N., Maguire, E.A., O'Keefe, J. 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. Neuron, 35: 625-641.

(25) Morrison, J.H., Hof, P.R. 2002. Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. Prog Brain Res., 136: 467-486.

(26) Azcoitia, I., Perez-Martín, M., Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Garcia-Segura, L.M., Tresguerres, JAF. 2005. Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus. Neurobiology of Aging, 26: 697-703.

(27) Salazar Nussio, V. Efectos del tratamiento con GH sobre el envejecimiento del SNC. Tesis Doctoral UCM, 2005.

(28) Frago, L.M., Paneda, C., Dickson, S.L., Hewson, A.K., Argente, J., Chowen, J.A. 2002. Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-

like growth factor I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. Endocrinology, 143: 4113-4122.

(29) López-Fernández, J., Sánchez Franco, F., Velasco, B., Tolón, R.M., Paros, F., Cacicedo, L. 1996. GH induces SS. and IGF-I gene expressión in the cerebral hemispheres of aging rats. Endocrinology, 137: 4384-4391.

(30) Reiter, R.J., Tan, D.X., Cabrera, J., *et al*. 1999. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. Biological Signals and Receptors, 8: 56-63.

(31) Reiter, R.J. 1998. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. Prog Neurobiol., 56: 359-384.

(32) Reiter, R.J. 2003. Melatonin: clinical relevance. Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism, 17: 273-285.

(33) Manda, K., Bhatia, A.L. 2003. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. Cell Biol Toxicol., 19: 367-372.

(34) Luskey, K.L. 1992. Growth and development. In textbook of Endocrine Physiol. Eds. J.E. Griffin and S.R. Ojeda. Oxford University Press, pp. 211-223.

(35) Hadley, M.E. 1992. Pituitary Hormones. In Endocrinology. Edit. Prentice-Hall International Editions. McE. Hadley ed.

(36) Tannenbaum, G.S., Ling, N. 1984. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. Endocrinology., 115(5): 1952-7.

(37) St Pierre, D.H., Wang, L., Tache, Y. 2003. Ghrelin: a novel player in the gut-brain regulation of growth hormone and energy balance. News Physiol Sci., v. 18, p. 242-246.

(38) Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., Kangawa, K. 2001. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the GH secretagogue receptor. Trends in Endocrinol. & Metabolism, 12: 118-121.

(39) Devesa, J., Tresguerres, JAF. Control de la secreción de GH. En: Retrasos del crecimiento, 2.ª ed. Moreno y Tresguerres eds. Ed. Díaz de Santos, Madrid (1996), pp. 45-60).

(40) Arce ,Vázquez V., Devesa Múgica, J. Hormona de crecimiento. En: Tratado de endocrinología básica y clínica. Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E., Devesa Múgica J., Moreno Esteban B. (eds.). Editorial Síntesis, Madrid 2000; pp. 337-378.

(41) Lima, L., Arce, V., Diaz, M.J., Tresguerres, J.A., Devesa, J. 1993. Glucocorticoids may inhibit growth hormone release by enhancing beta-adrenergic responsiveness in hypothalamic somatostatin neurons. J. Clin Endocrinol Metab., 76(2): 439-44.

(42) García Barros, M., Devesa. J.G.H., Proteínas transportadoras, Receptores, Acciones biológicas. En: Tratado de endocrinología básica y clínica. Tresguerres JAF,

Aguilar Benítez de Lugo, E., Devesa Múgica, J., Moreno Esteban, B. (eds.). Editorial Síntesis, Madrid 2000; pp. 379-418.

(43) Tresguerres, JAF. Somatomedinas y sus proteinas transportadoras. Retrasos del crecimiento. 1996, p. 61.

(44) Hughes, J.R., Friesen, H.G. 1985. The nature and regulation of the receptors for pituitary growth hormone. Ann. Rev. Physiol., 47: 469-482.

(45) Davidson, M.B. 1987. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. Endocrine Rev., 8: 115-122.

(46) Tresguerres, JAF. Hormona de crecimiento y envejecimiento. 1998. An. R. Acad. Nac. Medicina, CXV: 907-922.

(47) Isaksson, OGP, Lindahl, A., Nilsson, A., Isgaard, J. 1988. Action of growth hormone: current views. Acta Pediat. Scand., 343: 12-18.

(48) Hew, F.L., Oneal, D., Kamarudin, N., Alford, F.P., Best, J.D. Growth hormone deficiency and cardiovascular risk. En: Clinical Endocrinology and Metabolism. (1998) Edit. Bailliere's. S.M. Shalet Ed. Vol. 12 nº 2.

(49) Degerblad, M., Bengstsson, B.A., Bramnert, M., Johnell, O., Manhem, P., Rosen, T., Thoren, M. 1995. Reduced bone mineral density in adults with GH deficiency: Increase bone turnover during 12 months of GH substitution therapy. Eur J. Endocrinol., 133: 180-188.

(50) Rosen, T., Bengtsson, B.A. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. The Lancet 1990; 336: 285-288.

(51) Toogood, A.A., Shalet, S.M. 1998. Aging and growth hormone status. Baillieres Clin. Endocrino.l Metab., 12: 2, 281.

(52) Jorgensen, JOL, Pedersen, S.A., Thuesen, L., Jorgensen, J., Moller, J., Müller, J., Skakkaback, E.N., Christiansen J.S. 1991. Long-term GH treatment in GH deficient adults. Acta Endocrinol., 125: 449-453.

(53) Jorgensen, JOL, Thuesen, L., Müller, J., Ovensen, P., Skakkaback, EN, Christiansen, J.S. 1994. Three years of GH treatment in GH deficient adults: near normalization of body composition and physical performance. Eur. J. Endocrinol., 130: 224-228.

(54) Salomon, F., Cuneo, R.C., Hesp, R., Sönksen, P.H. 1989. The effects of treatment with recombinant human GH on body composition and metabolism in adults with GH deficiency. N. Engl. J. Med., 321: 1797-1803.

(55) Weaver, J.U, Monson, J.P., Noonan, W.G., Edwards, J.A., Evans, K.A. Cunningham, J. "The effect of low dose recombinant hGH replacement on regional fat dis-

tribution, insulin sensitivity and cardiovascular risk factors in hypopituitary adults. J. Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 153-159.

(56) Amato, G., Carella, C., Fazio, S., La Montagna, G., Cittadini, A., Sabini, D., Maricano-Mome, C., Sacca, L., Bellstela, A. 1993. Body composition, bone metabolism and heart structure and function in GH deficient adults before and after GH replacement therapy at low doses. J. Clin. Endocrinol. Metab., 77: 1671-1676.

(57) Nass, R., Huber, R.M., Klaus, V., Müller, O.A., Schopohl, J., Strasburger, C.J. 1995. Effect of hGH replacement therapy on physical work capacity and cardiac and pulmonary function in pacients with hGH deficiency acquired in adulthood. J. Clin. Endocrinol. Metab., 80: 552-557.

(58) Hoffman, A.R., Pyka, G., Lieberman, S.A., Ceda, G.P., Marcus, R. The somatopause. En. Growth hormone and somatomedins during lifespan. Müller E.E., Cocchi D., Locatelli V. (eds.). Springer Berlin (1993) 265-274.

(59) Ono, M., Miki, N., Shizume, K. 1986. Release of inmunoreactive growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin from incubated hypothalamus in young and old male rats. (Abstract). Neuroendocrinology, 43: 111.

(60) Locatelli, V., Cella, S.G., Loche, S., Pintor, C., Müller, E.E. Growth hormone releasing effect of hpGRF-40 in rats at different time intervals following ablation of the mediobasal hypothalamus. Life Sci. 1984; 35(19): 1989-95.

(61) Van Cauter, E., Plat, L. 1996. Physiology of GH secretion during sleep. The Journal of Pediatrics, 128: 532-537.

(62) Copinschi, G., Van Cauter, E. 1995. Effects of ageing on modulation of hormonal secretion by sleep and circadian rhytmicity. Horm Res., 43: 20-24.

(63) Rudman, D., Feller, A.G., Nagraj, H.S., Gergans, G.A., Lalitha, P.Y., Goldberg A.F., Schlenker, R.A., Cohn, L., Rudman, I.W., Mattson, D.E. 1990. Effects of human GH in men over 60 years old. N. Engl. J. Med., 323: I-6.

(64) Cuttica, C.M., Castoldi, L., Gorrini, G.P., Peluffo, F., Delitalia, G., Filippa, P., Fanciulli, G., Giusti, M. 1997. Effects of six-month administration of rhGH to healthy elderly subjects. Aging, 9: 193-197.

(65) Angelopoulos, T.J., Seip, R.L., Cole, T.G. 1998. Effect of short-term recombinant GH administration on plasma lipoproteins in elderly adults. Gerontology, 44: 228-231.

(66) Holloway, L., Butterfield, G., Hintz, R.L., Gesundheit, N., Marcus, R. Effects of recombinant hGH on metabolic indices, body composition and bone turnover in healthy elderly women. J. Clin Endocrinol. Metab. 1994; 79: 470-479.

(67) Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F. "Human recombinant growth hormone". En: Novel therapeutic proteins. Dembowsky K. and Stadler P. (eds.). Wiley-VCH (2001) pp. 60-85.

(68) Ariznavarreta, C., Castillo, C., Segovia, G., Mora, F., Azcoitia, I., Tresguerres, JAF. 2003. Growth hormone and aging. Homo, vol. 54: 132-141.

(69) Castillo, C., Cruzado, M., Ariznavarreta, C., Gil-Loyzaga, P., Lahera, V., Cachofeiro, V., Tresguerres, JAF. 2003. Body composition and vascular effects of growth hormone administration in old female rats. Experimental Gerontology, 38(9): 971-9.

(70) Tresguerres, A.F. Efecto de tratamientos Hormonales Crónicos sobre el Envejecimiento Cutáneo. Tesis Doctoral Facultad de Medicina, UCM (2005).

(71) Baeza, I., Alvarado, C., Ariznavarreta, C., Castillo, C., Tresguerres, Jaf. de la Fuente, M. 2008. Effect of GH treatment on lymphocyte functions in old male rats. J. Neuroimmunomodulation, 15: 282-287.

(72) Baeza, I., Alvarado, C., Alvarez, P., Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Tresguerres, JAF, De la Fuente, M. 2009. Improvement of leukocyte functions in ovariectomized old rats after treatment with growth hormone, melatonin, estrogens and phytoestrogens. J. Reproductive Immunology, 80: 70-79.

(73) Cardinali, D.P., Brusco, L.I., Cutrera, R.A. Ritmos biológicos. En: Tratado de endocrinología básica y clínica. Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E., Devesa Múgica J., Moreno Esteban B. (eds.). Editorial Síntesis, Madrid 2000; pp. 163-189.

(74) Acuña-Castroviejo, D., Escames Rosa, G., León López, J., Khady, H.. Melatonina, ritmos biológicos y estrés oxidativo. En: Longevidad. Tratado integral sobre la salud en la segunda mitad de la vida. Salvador-Carulla L., Cano Sánchez A., Cabo-Soler J.R. (eds.). Editorial Médica Panamericana, Madrid 2004; p. 216-224.

(75) Ianas, O., Olivescu, R., Badescu, I. 1991. Melatonin involvement in oxidative processes. Rom J. Endocrinology, v. 29, p.117-123.

(76) Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., Yan, M.T., El-Sawi M., Sainz R.M., Mayo J.C., Kohen R., Allegra M., Hardeland R. 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. Curr. Top. Med. Chem., 2: 181-198.

(77) Reiter, R.J., Tan, D.X., Cabrera, J., *et al*. 1999. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. Adv. Exp. Med. Biol., 467: 379-387.

(78) Reiter, R.J., Tan, D.X., Burkhardt, S. 2002. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. Mech Ageing Dev., 123: 1007-1019.

(79) Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E. 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. J. Biomed. Sci., 7: 444-458.

(80) Castillo, C., Salazar, V., Ariznavarreta, C., *et al*. 2005. Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats. J. Pineal Res, 38: 240-246.

(81) Kireev, R.A., Tresguerres, ACF., García, C., Ariznavarreta, C., Vara, E., Tresguerres, JAF. 2008. Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and proinflammatory damage. J. Pineal Research, 45;394-402.

(82) Kennaway, D.J., Lushington, K., Dawson, D., Lack, L., van den Heuvel, C., Rogers, N. Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and aging: new results and a critical review of the literature. J. Pineal Res. 1999; 27: 210-220.

(83) Magri, F., Sarra, S., Cinchetti, W., Guazzoni, V., Fioravanti, M., Cravello, L., Ferrari, E. Qualitative and quantitative changes of melatonin levels in physiological and pathological aging and in centenarians. J. Pineal Res. 2004; 36: 256-261.

(84) Benot, S., Goberna, R., Reiter, R.J., Garcia-Maurino, S., Osuna, C., Guerrero, J.M. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. J. Pineal Res. 1999; 27: 59-64.

(85) Andrade, J.P., Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M. 2000. Sexual dimorphism in the subiculum of the rat hippocampal formation. Brain Res., v. 875, p. 125-137.

(86) Woolley, C.S., McEwen, B.S. 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. J. Neurosci, v. 12, p. 2549-2554.

(87) Gould, E., Woolley, C.S., Frankfurt, M., McEwen, B.S. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. J. Neurosci., v. 10, p. 1286-1291.

(88) Hilton, G.D., Nunez, J.L., McCarthy, M.M. 2003. Sex differences in response to kainic acid and estradiol in the hippocampus of newborn rats. Neuroscience, v. 116, p. 383-391.

(89) Le Grevès, M., Steensland, P., Le Grevès, P., Nyberg F. Growth hormone induces age-dependent alteration in the expression of hippocampal growth hormone receptor and N-methyl-D-aspartate receptor subunits gene transcripts in male rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99(10): 7119-23.

(90) Vazquez, I., Gomez-De-Segura, I.A., Grande, A.G., Escribano, A., Gonzalez-Gancedo, P., Gomez, A., Diez, R., De Miguel, E. 1999. Protective effect of enriched diet plus growth hormone administration on radiation-induced intestinal injury and on its evolutionary pattern in the rat. Digestive Diseases and Sciences, v. 44, p. 2350-2358.

(91) Haimovitz-Friedman, A., Vlodavsky, I., Chaudhuri, A., Witte L., Fuks Z. 1991. Autocrine effects of fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells. Cancer Res., v. 51, p. 2552-2558.

(92) Noel, F., Tofilon, P.J. 1998. Astrocytes protect against X-ray-induced neuronal toxicity in vitro: Neuroreport, v. 9, p. 1133-1137.

(93) Castillo, C., Cruzado, M., Ariznavarreta, C. *et al*. 2005. Effect of rh GH administration on body composition and vascular function and structure on old Wistar male rats. Biogerontology, 6: 303-312.

(94) Sonntag, W.E., Bennett, S.A., Khan, A.S., Thornton, P.L., Xu, X.W., Ingram, R.L., Brunso-Bechtold J.K. 2000. Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats. Brain Research Bulletin, v. 51, p. 331-338.

(95) Thornton, P.L., Bennet, S.A., Sonntag, W.E. 1998. Insulin-like growth factor regulates activity of dopamine D2 receptors in aged animals. Soc. Neurosci, Abstract, v. 24, p. 1765.

(96) Lynch, C.D., Lyons, D., Khan, A., Bennett, S.A., Sonntag W.E. 2001. Insulin-like growth factor-1 selectively increases glucose utilization in brains of aged animals: Endocrinology, v. 142, p. 506-509.

(97) Azcoitia, I., Sierra, A., García Segura, L.M. 1999. Neuroprotective effect of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor I signalling. J. Neurosci. Res., 58(6): 815-822.

(98) Carro, E., Trejo, J.L., Busiguina, S., Torres-Aleman, I. 2001. Circulating insulin-like growth factor-I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. J. Neurosci, v. 21, p. 5678-5684.

(99) Carson, M.J., Behringer, R.R., Brinster, R.L., Mcmorris, F.A. 1993. Insulin-Like Growth Factor-I Increases Brain Growth and Central-Nervous-System Myelination in Transgenic Mice. Neuron, v. 10, p. 729-740.

(100) Beck, K.D., Powellbraxton, L., Widmer, H.R., Valverde, J., Hefti, F. 1995. Igf1 Gene Disruption Results in Reduced Brain Size, Cns Hypomyelination, and Loss of Hippocampal Granule and Striatal Parvalbumin-Containing Neurons. Neuron, v. 14, p. 717-730.

(101) Trejo, J.L., Carro, E., Lopez-Lopez, C., Torres-Aleman, I. 2004. Role of serum insulin-like growth factor I in mammalian brain aging. Growth Horm. IGF. Res., v. 14 Suppl. A, p. S39-S43.

(102) Trejo, J.L., Carro, E., Torres-Alemán, I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercice-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. J. Neurosci., 21: 1628-1634.

(103) Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R.J., Cooper, G.M., Segal R.A., Kaplan D.R., Greenberg M.E. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. Science, v. 275, p. 661-665.

(104) Morrison, J.H., Hof, P.R. 1997. Life and death of neurons in the aging brain. Science, v. 278, p. 412-419.

(105) Calhoun, M.E., Kurth, D., Phinney, A.L., Long, J.M., Hengemihle, J., Mouton P.R. 1998. Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. Neurobiology of Aging, v. 19, p. 599-606.

(106) Smith, D.E., Roberts, J., Gage, F.H., Tuszynski, M.H. 1999. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 96, p. 10893-10898.

(107) Tang, Y., Lopez, I., Baloh, R.W. 2001. Age-related change of the neuronal number in the human medial vestibular nucleus: A stereological investigation. Journal of Vestibular Research-Equilibrium & Orientation, v. 11, p. 357-363.

(108) Castillo Carmen, Veronica Salazar, Carmen Ariznavarreta, Elena Vara, Jesus, A.F. Tresguerres. 2004. Effect of recombinant human growth hormone on age-related hepatocyte changes in old male and female wistar rats. Endocrine, 25(1): 33-9.

(109) Peruzzi, F., Prisco, M., Dews, M., Salomoni, P., Grassilli, E., Romano, G., Calabretta, B., Baserga, R. 1999. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor-I receptor in protection from apoptosis. J. Mol. Cell. Biol., v. 19, p. 7203-7215.

(110) Garcia-Segura, L.M., Cardona-Gomez, G.P., Chowen, J.A., Azcoitia, I. 2000. Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. J. Neurocytol, v. 29, p. 425-437.

(111) Datta, S.R., H. Dudek, X., Tao, S., Masters, H.A., Fu, Y., Gotoh, M.E. Greenberg, 1997, Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery: Cell, v. 91, p. 231-241.

(112) Du, K., M. Montminy, 1998, CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB: J Biol Chem., v. 273, p. 32377-32379.

(113) Pugazhenthi, S., E. Millers, C., Sable, P., Young, K.A., Heidenreich, L.M., Boxer, JEB Reusch, 1999, Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein: Journal of Biological Chemistry, v. 274, p. 27529-27535.

(114) Scheid, M.P., V. Duronio, 1998, Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of bad and activation of PKB/akt: Involvement of MEK upstream of bad phosphorylation: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 95, p. 7439-7444.

(115) Wang, H.G., T. Miyashita, S. Takayama, T. Sato, T. Torigoe, S. Krajewski, S. Tanaka, L. Hovey, III, J. Troppmair, U.R. Rapp, 1994, Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase: Oncogene, v. 9, p. 2751-2756.

(116) Wang, H.G., U.R. Rapp, J.C Reed, 1996, Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria: Cell, v. 87, p. 629-638.

(117) Kireev, R.A., Tresguerres, A.C., Garcia, C., Borras, C., Ariznavarreta, C., Vara, E., Vina, J., Tresguerres, J.A. Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. Biogerontology. 2009 Jul 26.

(118) Kamada, M., Irahara, M., Maegawa, M. *et al*. (2001) Postmenopausal changes in serum cytokine levels and hormonereplacement therapy. Am J. Obstet Gynecol 184: 309–314.

(119) Yasui, T., Maegawa, M., Tomita, J., Miyatani, Y., Yamada, M. *et al*. (2007) Changes in serum cytokine concentrations during the menopausal transition. Maturitas 56: 396-403.

(120) Torres-Aleman, I. Pons, S. Arévalo, M.A. "The IGF I System in the rat cerebellum: Developmental Regulation and Role in Neuronal Survival and differenciation". J. of Neuroscience Research 39: 117-126 (1994).

(121) Duenas, M., I. Torres-Aleman, F. Naftolin, L.M. Garcia-Segura, 1996, Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation: Neuroscience, v. 74, p. 531-539.

(122) Fernández-Galaz, M.D., F. Naftolin, L.M. Garcia-Segura, 1999, Phasic synaptic remodeling of the rat arcuate nucleus during the estrous cycle depends on insulin-like growth factor-I receptor activation: Journal of Neuroscience Research, v. 55, p. 286-292.

(123) Cardona-Gomez, G.P., L. Doncarlos, L.M. Garcia-Segura, 2000, Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain: Neuroscience, v. 99, p. 751-760.

(124) García-Segura, L.M., I. Suarez, S. Segovia, P.A. Tranque, J.M. Cales, P. Aguilera, 1998c, The distribution of glial fibrillary acidic protein in the adult rat brain is influenced by the neonatal levels of sex steroids: Brain Res, v. 456, p. 357-363.

(125) García-Segura, L.M., M. Duenas, M.C. Fernandez Galaz, J.A. Chowen, J. Argente, F. Naftolin, I. Torresaleman, 1996, Interaction of the signalling pathways of insulin-like growth factor-I and sex steroids in the neuroendocrine hypothalamus: Hormone Research, v. 46, p. 160-164.

(126) Fernández, A.M., González de la Vega, A. And Torres Alemán, I. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. Neurobiology, vol. 95: 1253-1258 (1998).

(127) Dubal, D.B., P.J. Shughrue, M.E. Wilson, I. Merchenthaler, P.M. Wise, 1999b, Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: A potential role for estrogen receptors: Journal of Neuroscience, v. 19, p. 6385-6393.

(128) Wise, P.M., K. Scarbrough, G.H. Larson, J.M. Lloyd, N.G. Weiland, S.F. Chiu, 1991, Neuroendocrine Influences on Aging of the Female Reproductive-System: Frontiers in Neuroendocrinology, v. 12, p. 323-356.

(129) Kar, S., D. Seto, S. Dore, J.G. Chabot, R. Quirion, 1997, Systemic administration of kainic acid induces selective time dependent decrease in [I-125]insulin-like growth factor I, [I-125]insulin-like growth factor II and [I-125]insulin receptor binding sites in adult rat hippocampal formation: Neuroscience, v. 80, p. 1041-1055.

(130) Aberg, MAI, N.D. Aberg, H. Hedbacker, J. Oscarsson, P.S. Eriksson, 2000, Peripheral Infusion of IGF-I Selectively Induces Neurogenesis in the Adult Rat Hippocampus: Journal of Neuroscience, v. 20, p. 2896-2903.

(131) Lichtenwalner, R.J., M.E. Forbes, S.A. Bennett, C.D. Lynch, W.E. Sonntag, D.R. Riddle, 2001, Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis: Neuroscience, v. 107, p. 603-613.

(132) Castilla-Cortazar, I., M. Garcia, B. Muguerza, J. Quiroga, R. Perez, S. Santidrian, J. Prieto, 1997, Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis: Gastroenterology, v. 113, p. 1682-1691.

(133) Youn, Y.K., G.J. Suh, S.E. Jung, S.K. Oh, R. Demling, 1998, Recombinant human growth hormone decreases lung and liver tissue lipid peroxidation and increases antioxidant activity after thermal injury in rats: Journal of Burn Care & Rehabilitation, v. 19, p. 542-548.

(134) Tollet-Egnell, P., A. Flores-Morales, N. Stahlberg, R.L. Malek, N. Lee, G. Norstedt, 2001, Gene expression profile of the aging process in rat liver: Normalizing effects of growth hormone replacement: Molecular Endocrinology, v. 15, p. 308-318.

(135) Bartke, A., Brown-Borg, H.M., Bode, A.M., Carlson, J., Hunter, W.S. & Bronson RT. Does growth hormone prevent or accelerate aging? Exp Gerontol 1998; 33: 675-687.

(136) Brown-Borg, H.M., A.M. Bode, A. Bartke, 1999, Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone levels - Potential relationship in the aging process: Endocrine, v. 11, p. 41-48.

(137) Brown-Borg, H.M., S.G. Rakoczy, M.A. Romanick, M.A. Kennedy, 2002, Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidative enzymes: Experimental Biology and Medicine, v. 227, p. 94-104.

(138) Bartke, A. Is growth hormone deficiency a beneficial adaptation to aging? Evidence from experimental animals. Trends Endocrinol Metab 2003; 1: 340-344.

(139) Hauck, S.J., J.M. Aaron, C. Wright, J.J. Kopchick, A. Bartke, 2002, Antioxidant enzymes, free-radical damage, and response to paraquat in liver and kidney of long-living growth hormone receptor/binding protein gene-disrupted mice: Hormone and Metabolic Research, v. 34, p. 481-486.

(140) KIREEV, R.A., TRESGUERRES, A.F., VARA, E., ARIZNAVARRETA, C. AND TRESGUERRES, JAF. Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. Biogerontology 8: 469-482 (2007).

(141) KIREEV, R.A., TRESGUERRES, ACF, CASTILLO, C., SALAZAR, V., ARIZNAVARRETA, C., VARA, E., AND TRESGUERRES, JAF. Effect of exogenous administration of melatonin and GH on prooxidant functions of the liver in aging male rats. J. Pineal Research 42;64-70 (2007).

(142) Groesbeck, M.D., A.F. Parlow, W.H. Daughaday, 1987, Stimulation of Supranormal Growth in Prepubertal, Adult Plateaued, and Hypophysectomized Female Rats by Large Doses of Rat Growth-Hormone - Physiological-Effects and Adverse Consequences: Endocrinology, v. 120, p. 1963-1975.

(143) Wolf, E., E. Kahnt, J. Ehrlein, W. Hermanns, G. Brem, R. Wanke, 1993, Effects of Long-Term Elevated Serum Levels of Growth-Hormone on Life Expectancy of Mice - Lessons from Transgenic Animal-Models: Mechanisms of Ageing and Development, v. 68, p. 71-87.

(144) Daitoku, H., M. Hatta, H. Matsuzaki, S. Aratani, T. Ohshima, M. Miyagishi, T. Nakajima, A. Fukamizu, 2004, Silent information regulator 2 potentiates Foxo-1 mediated transcription through its deacetylase activity: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v. 101, p. 10042-10047.

(145) Araki, T., Y. Sasaki, J. Milbrandt, 2004, Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration: Science, v. 305, p. 1010-1013.

(146) Yeung, F., J.E. Hoberg, C.S. Ramsey, M.D. Keller, D.R. Jones, R.A. Frye, M.W. Mayo, 2004a, Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase: EMBO J., v. 23, p. 2369-2380.

(147) Parker, J.A., M. Arango, S. Abderrahmane, E. Lambert, C. Tourette, H. Catoire, C. Neri, 2005, Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons: Nat. Genet., v. 37, p. 349-350.

(148) Yeung, F., J.E. Hoberg, C.S. Ramsey, M.D. Keller, D.R. Jones, R.A. Frye, M.W. Mayo, 2004b, Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase: EMBO J., v. 23, p. 2369-2380.

(149) Hill, S.M., D.E. Blask, 1988, Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture: Cancer Res, v. 48, p. 6121-6126.

(150) Danilova, N., V.E. Krupnik, D. Sugden, I.V. Zhdanova, 2004, Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development: FASEB J., v. 18, p. 751-753.

(151) Shiu, S.Y., L. Li, S.W. Siu, S.C. Xi, S.W. Fong, S.F. Pang, 2000, Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis: Biol Signals Recept., v. 9, p. 172-187.

(152) Drazen, D.L., R.J. Nelson, 2001, Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity: Neuroendocrinology, v. 74, p. 178-184.

(153) Frisch, S.M., 2000, cAMP takes control: Nat. Cell. Biol., v. 2, p. E167-E168.

(154) Kim, M.J., H.K. Kim, B.S. Kim, S.V. Yim, 2004, Melatonin increases cell proliferation in the dentate gyrus of maternally separated rats: Journal of Pineal Research, v. 37, p. 193-197.

(155) Osborne, N.N., M.S. Nash, J.P. Wood, 1998, Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: Invest Ophthalmol. Vis. Sci., v. 39, p. 2374-2383.

(156) Sainz, R.M., J.C. Mayo, C. Rodriguez, D.X. Tan, S. Lopez-Burillo, R.J. Reiter, 2003, Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells: Cell Mol. Life Sci., v. 60, p. 1407-1426.

(157) Acuña-Castroviejo, D., Martín, M., Macias, M., Escames, G., Leon, J., Khaldy, H., Reiter, R.J. 2001. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. J. Pineal Res. 30: 65-74.

(158) Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Carazo A, Leon, J., Khaldy, H., Reiter, R.J. 2001. Melatonin, mitocondrial homeostasis and mitocondrial related diseases. Curr Topics Med. Chem 2: 133 (2002).

(159) Gupta,Y.K., M. Gupta, K. Kohli, 2003, Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain: Indian J. Physiol Pharmacol., v. 47, p. 373-386.

10. Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas

DRA. CONCHA CERDÁ MICÓ

Unidad de Endocrinología. Servicio de Análisis Clínicos. CDB Hospital General Universitario de Valencia

DRA. SILVIA BORREGO OLIVA

Médico Residente de Análisis Clínicos. Servicio de Análisis Clínicos. CDB Hospital General Universitário de Valencia.

DR. GUILLERMO SÁEZ TORMO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Servicio de Análisis Clínicos. CDB, Hospital General Universitario de Valencia

RESUMEN

El sistema nervioso central juega un papel de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis y funciones fisiológicas de los animales. Sin embargo, sus características bioquímicas y citológicas lo convierten en un tejido vulnerable a la acción de numerosos agentes citotóxicos. Entre los mecanismos desencadenantes de neurodegeneración y muerte cerebral se encuentra el estrés oxidativo producido por la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno molecular. Existe una estrecha relación entre el estrés oxidativo y la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas. La acción de las hormonas contribuye y es esencial en la modulación de los efectos citotóxicos inducidos por el estrés oxidativo. En este capítulo se revisan aspectos relevantes sobre las implicaciones fisiopatológicas de este fenómeno citotóxico en las enfermedades más representativas de carácter neurodegenerativo.

ABSTRACT

The central nervous system plays a very important role in the maintenance of homeostasis and physiological functions in animals. However, its biochemical and cytological characteristics make it vulnerable to the action of different cytotoxic agents. Among the mechanisms leading to neurodegeneration and cell death, reactive oxygen species-induced oxidative stress plays a pivotal role. There is a close relation between oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Hormonal action on neuronal cells is also essential for the modulation of oxidative stress-induce cytotoxicity. In the present chapter, the pathophysiological implications of oxidative stress in most representative neurodegenerative diseases is reviewed and discussed.

1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos, que dependen del oxígeno para la obtención de energía metabólica en forma de ATP, producen además especies moleculares oxidantes cuya reactividad y potencial citotóxico debe ser estrictamente controlada. Dicho control se lleva a cabo por moléculas conocidas como antioxidantes. Una porción del oxígeno que respiramos se reduce, por una vía alternativa de la citocromo oxidasa, dando lugar a formas moleculares parcialmente reducidas de oxígeno (ROS, de Reactive Oxygen Species) responsables del fenómeno conocido como "Estrés Oxidativo" (EO) (figura 1)(1).

Existen numerosas situaciones en las que la formación de ROS aumenta, como ocurre en alteraciones nutricionales y metabólicas, en la exposición a contaminantes ambientales, durante procesos de sobrecarga física, o bien, en esta-

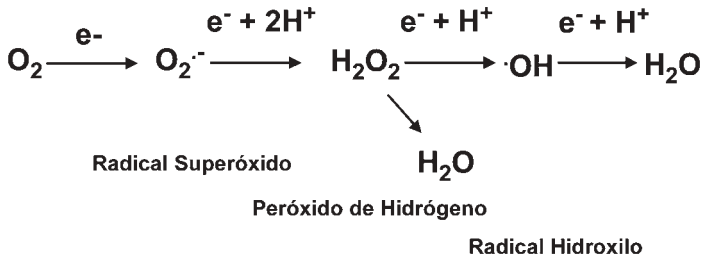


Figura 1. *Reducción monovalente del oxígeno molecular. El oxígeno se reduce por la vía alternativa de citocromo oxidasa por un mecanismo secuencial, monovalente, por el que capta electrones de forma progresiva y da lugar a las especies reactivas superóxido, peroxido de hidrógeno y radical hidroxilo.*

dos carenciales de las funciones orgánicas como el cáncer y el envejecimiento (2). La reactividad de los ROS les permite interaccionar con macromoléculas de diversa naturaleza, entre las que se incluyen los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, modificando su estructura y su función (figura 2). Diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos y, especialmente aquellos de carácter degenerativo, se han visto implicados en su mecanismo patogénico con la formación de especies reactivas (3). En la actualidad, el estudio de los productos de oxidación molecular y su posible utilidad como marcadores clínicos, se presente como un aspecto prometedor de la investigación biomédica (4,5).

Para contrarrestar los efectos deletéreos del EO las células han desarrollado a lo largo de su evolución mecanismos moleculares muy efectivos conocidos como antioxidantes de los cuales existe una gama muy variada que proporciona al organismo una cobertura defensiva muy eficaz. Un antioxidante es aquella molécula capaz de prevenir y/o evitar la oxidación de otra molécula, bien por interacción y estabilización de especies reactivas, bien por la transformación de éstas en configuraciones más estables y de reactividad reducida (1,6).

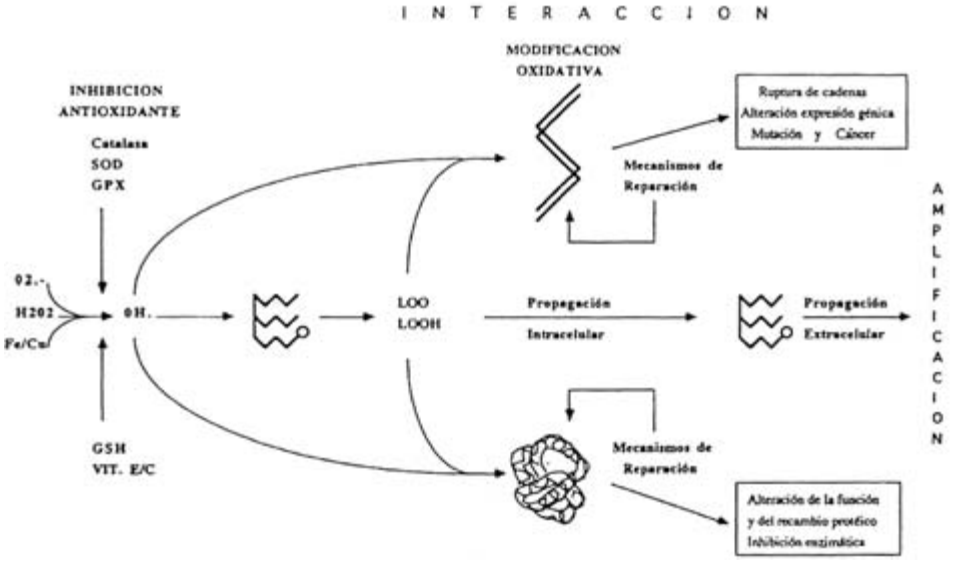


FIGURA 2. *Interacción de radicales libres hidroxilo con las biomoléculas celulares y sus efectos citotóxicos. Los radicales libres hidroxilo (·OH) atacan e inducen modificaciones oxidativas a estructuras fosfolipídicas, ácidos nucleicos y proteínas. Las consecuencias de esta interacción son muy variadas y conducen a diversas formas de distorsión metabólica. Algunos de los productos de degradación son los encargados de propagar el efecto citotóxico.*

Su función homeostática es de gran importancia, ya que mantienen a las especies reactivas por debajo de sus umbrales citotóxicos. No debemos olvidar que la formación de ROS es el resultado del consumo de oxígeno, incluso en condiciones fisiológicas o controladas y se dice que, en estas condiciones, ejercen efectos reguladores de gran importancia fisiológica (1).

En términos generales, los antioxidantes biológicos pueden dividirse en dos grandes grupos de moléculas. Aquellas de estructura compleja y elevado peso molecular que constituye el grupo de las enzimas antioxidantes, y los de menor tamaño y peso molecular entre los que se encuentran las vitaminas E, C, el glutatión reducido (GSH), el ácido úrico, los carotenos, los compuestos fenólicos, etc (1,6,7). La protección antioxidante, para ser eficaz, requiere la actuación sincronizada de tres enzimas, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (Cat.) y la glutatión peroxidasa (GPx). Se trata de reducir a las especies reactivas superóxido y peroxido de hidrógeno a moléculas más estables, evitando así, la formación de la especie oxigenada más reactiva, el radical hidroxilo (·OH) (figura 3) (3,5). Estudios epide-

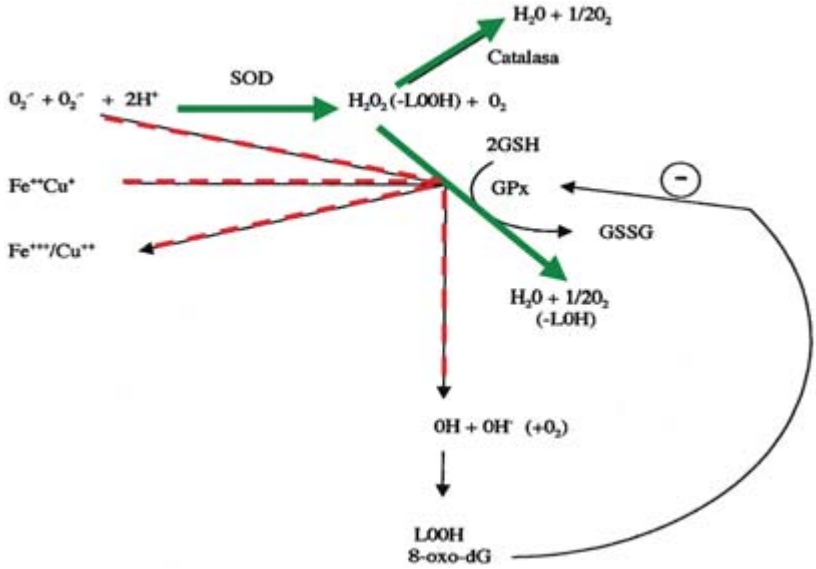


FIGURA 3. *Actividad sincronizada de enzimas antioxidantes en la metabolización de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno e inhibición de la formación de radicales hidroxilo. La actuación de la SOD junto a las actividades catalasa y Gpx de forma sincronizada (líneas continuas) es la forma más eficaz de reducir las concentraciones de superóxido y peróxido de hidrógeno. Este mecanismo defensivo tiene como principal objetivo evitar la interacción entre ambos o bien del peroxido de hidrógeno con metales de transición (líneas discontínuas) impidiendo así la formación de radicales hidroxilo a través de las reacciones de Haber-Weiss of Fenton respectivamente.*

miológicos señalan que las personas que consumen antioxidantes padecen menos de enfermedades cardiovasculares (8,9), de cáncer (10) y de procesos neurodegenerativos (11,12), si bien los resultados obtenidos no están exentos de evidencias contrapuestas, lo que sugiere que para alcanzar conclusiones sólidas al respecto es necesario un mayor número de ensayos y estudios epidemiológicos (13,14).

2. ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Si bien la totalidad de las células aeróbicas son susceptibles de sufrir los efectos del EO, el cerebro de los mamíferos es todavía más vulnerable a la acción nociva de los ROS. Una de las razones es su alto consumo de oxígeno. En los humanos el cerebro representa una fracción reducida del peso corporal, sin embargo, su consumo de oxígeno es aproximadamente el 20% del total. El contenido de oxígeno por unidad de masa tisular es, por lo tanto, muy alta.

El cerebro adulto contiene entre 10^{11} a 10^{12} células nerviosas (neuronas), mantenidas y protegidas por un número muy superior de otras células conocidas como glía. Estas últimas desempeñan funciones de gran importancia como soporte a las funciones de las neuronas y a la fisiología en el sistema nervioso. Entre ellas se diferencian tres grupos principales de células que son, la microglía, los astrocitos y los oligodendrocitos. Los astrocitos son los encargados de colaborar con el metabolismo de las neuronas y proteger a éstas, además de estar implicados en la función de la barrera hemato-encefálica. Están presentes en las terminaciones sinápticas y en los nódulos de Ranvier (15). Los oligodendrocitos, por su parte, se encargan de la síntesis y formación de las vainas mielínicas que aíslan a la mayoría de los axones. Si bien es generalmente asumida la idea de que el número de neuronas permanece constante y que éstas no se dividen, la identificación y aislamiento de células adultas regeneradoras parece abrir un nuevo concepto sobre la neurogénesis. En términos generales se asume que las neuronas están más expuestas que la glía al EO y que este fenómeno también afecta a las células de la barrera hematoencefálica.

Como se deduce del alto consumo de oxígeno del cerebro, su metabolismo energético es muy activo. La mayor parte del oxígeno que llega a las células neuronales se utiliza para su reducción tetravalente y síntesis de moléculas de ATP necesarias para mantener el gradiente iónico (concentración elevada de K^+, baja de Na^+ y muy reducida de Ca^{++}). La bomba de Na^+/K^+-ATPasa, es la encargada de captar y bombear posteriormente los iones Na^+ para el correcto mantenimiento de la transmisión nerviosa.

La producción de energía metabólica del cerebro depende, casi exclusivamente de la utilización de glucosa a través de la vía glucolítica y ciclo de Krebs y el requerimiento energético se estima alrededor de $4x10^{21}$ moléculas de ATP/minuto. El ácido láctico, que toma de la circulación o suministrado por la glucólisis anaerobia de los astrositos, puede ser utilizado como sustrato alternativo previamente convertido por la lactado deshidrogenasa NAD-dependiente. Sin embargo, como bien es sabido, el sistema nervioso es muy susceptible a la hipoglucemia ya que su contenido en glucógeno es muy reducido. De la misma forma que, al depender metabólicamente de la fosforilación oxidativa, se convierte en un órgano muy vulnerable a la hipóxia. De hecho, los inhibidores de síntesis mitocondrial de ATP, como la rotenona o el ácido 3-nitropropiónico, producido por algunos hongos, inducen neurotoxicidad y causan la muerte neuronal de animales y humanos. (16).

Las neuronas también utilizan energía para la secreción de neurotransmisores por mecanismo de exocitosis. Entre los neurotransmisores más conocidos se encuentran la dopamina, la serotonina, la noradrenalina, el gamma-aminobutirato (GABA), la glicina y el ácido glutámico. La acetilcolina es otro neurotransmisor que también se libera en las terminaciones nerviosas que inervan los músculos de contracción voluntaria. La inhabilidad de la mayoría de las neuronas para dividirse conduce a la pérdida de las funciones cerebrales cuando éstas mueren. Afortunadamente, muchas áreas cerebrales presentan cierta plasticidad cerebral. Las neuronas en cultivo son susceptibles a padecer injurias previas a la necrosis o apoptosis si se exponen a diversas toxinas que interfieren con el metabolismo energético, la presencia de especies reactivas como el peroxintrito ($ONOO^-$) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o bien, si se retiran del medio los factores neurotróficos. Durante el desarrollo cerebral, es crucial la regulación ejercida por diversos factores de crecimiento. Son especialmente importantes el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico ciliar, las neurotrofinas 3, 4 y 5 así como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF). Por ejemplo, el BDNF parece estar implicado en el mantenimiento de la memoria dependiente del hipocampo. Algunos humanos poseen una mutación de este factor consistente en el cambio de valina por metionina en posición 66 que se ha sugerido ser responsable de la falta de memória (17). Todos estos factores son capaces de proteger a las neuronas en cultivo frente a diversos tipos de lesiones o efectos citotóxicos y se sabe que, junto a esta función de soporte neuronal, actúan induciendo la síntesis de antioxidantes. En definitiva, las causas y mecanismos que hacen del cerebro un tejido especialmente susceptible a la impronta de las especies reactivas son numerosos y variados, tanto desde el punto de vista bioquímico, molecular como fisiológico (Figura 4).

1. Aumento facilitado de calcio intracelular, activación de nNOS, fosfolipasa A2 y calpainas.
2. Presencia de aminoácidos exitotóxicos, incremento de especies reactivas, O_2.-, NO y liberación de glutamato.
3. Actividad mitocondrial incrementada y formación de ROS.
4. Autooxidación de neurotransmisores (Dopamina,Serotonina, L-Dopa) y depleción de antioxidantes (GSH)
5. Tasas elevadas de metales de transición en estado libre (Fe/Cu) y catálisis de la reacción de Fenton.
6. Contenido elevado de ácidos grasos polidesaturados (PUFA) en las membranas neuronales.
7. Enzimas cerebrales generadoras de H_2O_2 (Monoamino oxidasas)
8. Contenido reducido de enzimas antioxidantes, especialmente de Catalasa.
9. Efecto de las citoquinas inductores de ROS sobre la microglía y astrocitos.
10. Actividad del sistema Citocromo P450 en la biotransformación de agentes neurotóxicos.

FIGURA 4. *Implicaciones del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas.*

3. HORMONAS Y ESTRÉS OXIDATIVO A NIVEL CEREBRAL

El efecto y las consecuencias de la administración hormonal es un aspecto de gran importancia en la respuesta de las neuronas al EO. También se sabe que las alteraciones o efectos citotóxicos que acontecen en estadios tempranos del desarrollo tienen su repercusión patológica en la edad adulta. Existe evidencia sólida sobre el efecto que induce la administración de hormonas como **los glucocorticoides (GC)** sobre el desarrollo de las distintas especies animales. Los corticoides pueden producir disfunciones cerebrales, pérdida del número de neuronas, e incremento de la densidad glial, lo que sugiere un acelerado paso hacia los cambios patogénicos que suceden durante el envejecimiento (18,19). En un estudio reciente se demuestra que las mujeres sometidas a estrés presentan telómeros acortados y mayor grado de EO, lo que apoya la idea de que los GC pueden ser la causa de un envejecimiento prematuro (20). Por otra parte, la exposición de ratas preñadas a dosis elevadas de GC (0.1mg/Kg de dexametasona) produce en las células cerebelosas de los animales recién nacidos un aumento de la apoptosis inducida por EO en comparación con las células de los nacidos de madres no tratadas hormonalmente. Este efecto se acompaña de una disminución de los niveles de catalasa del 40% en estas células cerebelosas afectadas por el EO bajo el efecto de los GC (21) Otros factores hormonales implicados en la regulación de la producción de EO y actividad de sistemas antioxidantes son **la hormona de crecimiento (GH) y el IGF-I**, si bien su papel es todavía controvertido y no exento de cierta polémica. Por un lado se ha demostrado que la administración de GH e IGF-1 ejerce un efecto protector en varios modelos experimentales de daño hepático inducido por radicales libres (22). También se ha demostrado que la cepa de ratas Mini, de-

ficitarias en GH, es más sensible a la acción de diferentes agentes hepatotóxicos (23). Sin embargo, existen otros datos experimentales que indican que las hormonas del eje somatotropo podrían ejercer un efecto pernicioso sobre la expectativa de vida y las defensas antioxidantes. Los ratones transgénicos que sobreexpresan GH presentan una expectativa de vida disminuida, una expresión fenotípica de un envejecimiento prematuro y niveles más elevados de EO, mientras que los ratones enanos Ames, que son deficitarios en GH, Prolactina y TSH, viven mucho más que los ratones normales de la misma cepa (24). Es posible que las diferencias encontradas en relación a esta disparidad de efectos por parte de la GH se deban o tengan que ver con las distintas etapas de desarrollo de los animales utilizados, ya que no es lo mismo tener niveles elevados de esta hormona desde el nacimiento que actuar con dosis fisiológicas en edades avanzadas, donde los niveles hormonales están más bajos (25).

A **los estrógenos**, sin embargo, se les atribuye funciones protectoras contra el EO con bastante unanimidad en este sentido. Por ejemplo, se ha comprobado que las mitocondrias aisladas de macho o hembras ovariectomizadas presentan mayor tasa de producción de peróxidos, mayor daño oxidativo en el DNA y menor concentración de glutatión (GSH) que las hembras intactas (26). Aunque en muchos trabajos se apunta hacia un efecto directo de estos compuestos de estructura cíclica y a sus análogos como la ginesteína como antioxidantes, las evidencias experimentales más recientes señalan, además un efecto inductor de señalizaciones moleculares que actúan induciendo la expresión de enzimas antioxidantes. La terapia hormonal sustitutiva ha demostrado tener efectos positivos sobre la reducción de la oxidación de las LDL y proteínas en mujeres postmenopáusicas (27,28). No cabe duda de que los estrógenos tienen efectos beneficiosos sobre el tejido nervioso a distintos niveles y que ejercen acciones neuroprotectoras en distintos modelos de daño neuronal como el EO, la excitotoxicidad, la hipoxia, etc. (29).

En lo que respecta al papel antioxidante de las hormonas, **la melatonina** es quizá la de acción más experimentada y reconocida. Su función más conocida es la regulación de los ciclos biológicos. Está considerada como uno de los sincronizadores internos más importantes, al modular la actividad del núcleo supraquiasmático, por que parece ser el "marcapasos central" también conocido como "reloj biológico"(30). El efecto antioxidante de la melatonina depende tanto de su acción directa sobre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como de su capacidad para inducir la síntesis de enzimas antioxidantes. La melatonina neutraliza la acción de especies reactivas como el radical. $^{\cdot}OH$, el H_2O_2, el $^1O_2$, el ión $ONOO^-$, el radical $LOO^{\cdot}$, e incluso el NO a través de mecanismos

independientes del receptor. Sus propiedades lipofílicas le permiten atravesar las barreras biológicas y las membranas celulares con facilidad, difundiendo a todos los compartimentos intracelulares y llegar hasta el mismo lugar donde se generan los radicales libres para su neutralización. Además de esta acción antioxidante directa, esta hormona procedente de la glándula pineal, interviene en la síntesis y reciclaje del GSH, y en la expresión de SOD y de catalasa. Estos efectos son mediados a través de su receptor. También se ha descrito su efecto protector contra la acción de distintas toxinas bacterianas y contra la acción neurotóxica de la proteína amiloide, implicada en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (31).

4. IMPLICACIONES DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan morfológicamente por la pérdida progresiva de células en poblaciones neuronales vulnerables específicas del sistema nervioso central asociadas, a menudo, a los agregados de proteínas que forman inclusiones intracitoplásmicas e intranucleares en neuronas y células de la glía.

Para clasificar a la mayoría de los desordenes neurodegenerativos nos basaremos en los mecanismos genéticos hasta ahora conocidos o bien nos referiremos a los componentes principales de las inclusiones de proteínas celulares, fenómenos directa o indirectamente relacionados con la formación de ROS y estrés oxidativo.

Los procesos básicos que inducen neurodegeneración se consideran multifactoriales, entre los que podemos incluir factores genéticos, ambientales y, de otro lado, se encuentran los considerados endógenos que incluyen dinámicas anormales de las proteínas como degradación y agregaciones defectuosas de las proteínas (base histopatológica principal de estas enfermedades), muchas de ellas relacionadas con el sistema ubiquitina-proteosoma, encargado de la señalización para su degradación por el componente 26S del proteosoma influyen además otros factores como el estrés oxidativo y formación de radicales libres funciones bioenergéticas y mitocondriales alteraciones de las funciones y los procesos neuroinflamatorios. Estos mecanismos que se correlacionan generalmente con los sistemas complejos que conducen a las cascadas programadas de la muerte celular tienen su papel en la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas. Los estudios de patología molecular han permitido identificar de forma específica algunas de las alte-

raciones proteicas características de cada uno de los procesos neurodegenerativos y así se asocia a la enfermedad de Alzheimer con la producción del péptido de 42 aminoácidos, amiloide, a la enfermedad de Parkinson con los depósitos de α-sinucleína, componente importante de los cuerpos de Lewy, a la proteína Tau y tauopatías y producción de ovillos neurofibrilares con la demencia frontotemporal y los desordenes de las poliglutaminas con la enfermedad de Hutington (32).

Existen estudios que relacionan la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas mencionadas, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, etc con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) asociadas con disfunción mitocondrial.

El genoma mitocondrial tiene una participación esencial en la patogénia de estas enfermedades basado en la observación del descenso en la actividad del complejo de la cadena respiratoria, defectos asociados al desequilibrio oxidante-antioxidante en los que se supone subyacen alteraciones en el metabolismo energético que inducen degeneración celular (33).

El DNA mitocondrial se localiza cerca de la membrana interna donde los ROS se producen como consecuencia de la respiración mitocondrial, y así se convierte en una de las dianas inmediatas de los ROS que llevarán al daño oxidativo y las consiguientes mutaciones. Se ha comprobado que la disfunción mitocondrial y la apoptosis intervienen de una forma muy importante en el desarrollo y progresión de las enfermedades mitocondriales y degenerativas. El DNA mitocondrial (DNAmit) al acumular mutaciones repercute en la expresión y la actividad anómala de proteínas implicadas en la síntesis de ATP desacoplando la cadena de transporte electrónico con la fosforilación oxidativa y generando más ROS. La sobreproducción de ROS por las mitocondrias disfuncionales puede causar daño oxidativo en las células produciendo alteraciones en sus funciones bioquímicas y fisiológicas y alterar los perfiles de la expresión genética llevando a las células a la apoptosis. Además el déficit de histonas protectoras en el DNAmit tiene como consecuencia la mutación y el daño oxidativo a esta molécula (34).

Los oligodendrocitos son células maduras de la glia que mielinizan axones en el cerebro y la médula espinal. Tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, los oligodendrocitos y sus precursores son vulnerables a la inflamación, estrés oxidativo y a la elevada concentración de glutamato que puede derivar en excitotoxicidad. La excitotoxicidad está relacionada con la muerte neuronal producida por la activación de receptores de los aminoácidos excitadores

—glutamato— que provoca la entrada de calcio a la célula, a la mitocondria, disfunción metabólica y la producción de radicales libres que interfieren en una de las funciones más importantes de las mitocondrias que es el control de las vías específicas de la apoptosis. Así estas células comienzan a ser disfuncionales o mueren en múltiples patologías que incluyen enfermedad de Alzheimer, lesiones de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, hipoxia e isquemia cerebral (35).

El estrés oxidativo (EO) es, como se ha señalado, uno de los factores predisponentes en las alteraciones neurobiológicas. La peroxidación lipídica puede causar la alteración de la membrana celular hasta llegar a su destrucción; los marcadores precoces y tardíos de la peroxidación lipídica incluyen los aductos de hexanonil —lisina (HEL), acroleina— lisina (ACR) y 4-8 hidroxinonenal (4-HNE). El daño oxidativo del DNA y RNA produce 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-oxo-dG) y 8-hidroxiguanina (8-oxo-dGo), respectivamente, los cuales son considerados como marcadores de elección en la valoración EO y su poder mutagénico es muy elevado (1, 2, 36).

El daño oxidativo de estas biomoléculas puede contribuir a la pérdida de función o a la exacerbación del daño. El cerebro, como hemos apuntado, es particularmente susceptible al daño oxidativo por su elevado ratio de consumo de oxigeno, por su alta demanda de energía, gran abundancia de ácidos grasos poliinsaturados y lípidos y su relativa capacidad antioxidante respecto a otros órganos. Generalmente, el 2% del oxigeno consumido por las células durante la fosforilación oxidativa se convierte en ROS, sin embargo este debe ser mayor en los sujetos con deficiente fosforilación oxidativa como es el caso de la enfermedad de Alzheimer sugiriendo que el daño oxidativo puede ser un hecho precoz en la patogenia de esta enfermedad.

El ataque oxidativo del DNA por los ROS, particularmente los radicales hidroxilo, pueden conducir a fragmentaciones de las hebras, mutaciones y alteraciones del intercambio de las cromátidas y translocaciones.

Ciertas características hacen a los oligodendrocitos más susceptibles al daño oxidativo-elementos indispensables para sintetizar cantidades grandes de mielina, capa aislante que rodea a los axones y acelera la conducción del impulso nervioso. Se ha especulado que un OLD puede formar unas tres veces su peso en membrana de mielina al día durante la mielinización. Para producir y mantener este volumen, se estima que los OLDs poseen el índice metabólico más alto que cualquier célula en el cerebro. Dado que la producción de mielina es energía dependiente, grandes cantidades de ATP se consumen en el proceso que se traduce en la producción creciente de ATP y el consumo significativo de oxí-

geno. Un subproducto tóxico de la síntesis del ATP es el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno también es producido por los peroxisomas, que son abundantes en los OLDs debido a su necesidad de producir cantidades grandes de lípidos. Otra razón de la susceptibilidad del OLD a la oxidación es que muchas enzimas metabólicas y de síntesis de mielina requieren el hierro como cofactor (OLDs y sus progenitores tienen los almacenes intracelulares más grandes de hierro en el cerebro del adulto) mientras que el hierro es necesario para la producción del mielina, es también altamente reactivo y puede provocar peroxidación, formación de radicales libres y de lípidos. Por ejemplo, el hierro cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno a radicales hidroxilo, que dañan directamente los compartimentos intracelulares. Paradójicamente, los OLDs tienen concentraciones bajas de glutatión (GSH), un sustrato antioxidante muy potente. Esta concentración baja de GSH permitiría que los niveles intracelulares del peróxido llegaran a ser peligrosamente elevados si se elevan también los niveles intracelulares del hierro. Así, la función del OLD pone estas células en riesgo de daño bien sea por los efectos oxidativos o por el aumento intracelular del hierro. Estas condiciones se han observado en varias entidades patológicas asociadas a pérdida de OLDs, incluyendo Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Alzheimer, lesión de la médula espinal, hipoxia del Sistema Nervioso Central y la isquemia. (37)

4.1. La enfermedad de Alzheimer

La degeneración sináptica y la muerte de neuronas en las regiones limbica y cortical del cerebro son los procesos fundamentales responsables de la manifestación de la disfunción cognitiva y otras facultades psíquicas en la enfermedad de Alzheimer (EA). A pesar de que los factores genéticos y ambientales y el proceso de envejecimiento pueden conducir por sí mismos a las manifestaciones de EA, múltiples evidencias de estudios en modelos experimentales y en tejido cerebral de pacientes con EA demuestran que la neurodegeneración subyacente está asociada a las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis. A nivel celular, la apoptosis neuronal en EA se puede iniciar por el estrés oxidativo y el daño relacionado del DNA, interrupción de la homeostasis celular del calcio, o estrés del retículo endoplásmico. Los mecanismos moleculares de las cascadas bioquímicas de la apoptosis implican efectores tales como PAR4, p53, y pro-apoptóticos miembros de la familia Bcl-2, mediadores de la disfunción mitocondrial y lanzamiento subsecuente de sustratos y proteínas pro-apoptóticas, tales como Citocromo c o Factor Inductor de apoptosis (FIA), y vías

caspasa-dependiente e independientes que finalmente dan lugar a la degradación de proteínas y del DNA nuclear. La regulación de las cascadas apoptóticas es compleja e implica control transcripcional así como modificaciones post-transcripcionales de la proteína (33).

Como en la mayoría de enfermedades degenerativas, la etiología mitocondrial se puede aplicar a la etiología de la EA. La primera indicación de que la disfunción mitocondrial puede causar EA proviene del descubrimiento de que la exposición de humanos y roedores al 1-miryil-4fenil-1,2,3,4-tetrahidropiridina induce la muerte de la substancia negra en las neuronas dopaminérgicas. Esto ha sido correlacionado con la inhibición del complejo de la fosforilación oxidativa mitocondrial y el incremento de la producción de ROS (37, 38, 39).

La EA es una alteración neurodegenerativa de aparición tardía, progresiva, relacionada con la edad, caracterizada por un deterioro progresivo cognitivo y la presencia de una sustancia llamada, amiloide, placas seniles y ovillos neurofibrilares de tau.

En la patogénia de la enfermedad está ampliamente implicada la disfunción mitocondrial que viene demostrada por la disfunción de la actividad de tres enzimas como son piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y cetoglutarato deshidrogenasa observada en cerebros y fibroblastos analizados postmortem. Recientemente se han observado defectos en procesos autofágicos de degradación de la mitocondria. (40).

4.2. La enfermedad de Parkinson

Tanto las formas familiar como la esporádica de la enfermedad de Parkinson (EP) son indistinguibles y comparten la misma característica bioquímica que es el déficit de dopamina cerebral, una reducción en la transmisión dopaminérgica dentro de los ganglios basales. En el examen microscópico hay degeneración de las células dopaminérgicas y presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas de la sustancia negra mesencefálica que se proyectan hasta el cuerpo estriado (vía nigroestriada) pero la extensión de la pérdida neuronal no sólo se centra en el sistema dopaminérgico sino que afecta a otros neurotransmisores clásicos como el catecolaminérgico (acetilcolina) y los núcleos no catecolaminérgicos. De esta manera, los síntomas motores de la enfermedad están relacionados con los sistemas dopaminérgicos y las manifestaciones no motoras están relacionadas con las vías no dopaminérgicas

En un estudio reciente sobre la relación de la EP con el estrés oxidativo se ha procedido a establecer los siguientes mecanismos causales entre ambas entidades.

El cerebro es rico en fosfolípidos y ácidos grasos libres poliinsaturados (PUFAS) y ambos son muy susceptibles a los oxidantes.

A consecuencia del daño oxidativo a los fosfolípidos y PUFAS, la doble membrana lipídica puede resultar afectada en la EP en la que la concentración de substancia negra está disminuida y la concentración de malonildialdehido, un producto de la oxidación lipídica, está incrementada. Otra evidencia de la oxidación lipídica en esta enfermedad es el incremento de 4-hidroxi-2-nonenal, producto lipofílico de la peroxidación de la membrana unido al ácido araquidónico. Los tipos de variante de sinucleína, la mutante y la natural, forman fibrillas de amiloide semejantes a las observadas en los cuerpos de Lewy así como oligómeros no fibrilares denominados protofibrillas a las que se ha propuesto como formas toxicas de sinucleína. Los productos como 8-oxo-dG se han encontrado aumentados en muestras postmortem de substancia negra procedentes de cerebros con EP.

En las neuronas es necesario un equilibrio entre la cantidad producida y la eliminada de oxidantes y este equilibrio es el que mantendrá con niveles constantes a las especies ROS y RNS en concentraciones no tóxicas. Entre los enzimas captadores de ROS, la superoxido dismutasa (SOD), considerada como la más importante, en la isoforma citosólica SOD1 no se han encontrado cambios pero sí en la isoforma mitocondrial SOD2 que muestra actividad aumentada al parecer en respuesta al exceso de ROS en la Enfermedad de Parkinson. En relación al resto de enzimas antioxidantes, catalasa, glutatión peroxidasa, muestran actividad reducida en cerebros con EP.

En una situación fisiológica, en las mitocondrias se produce el mayor consumo de oxigeno y como resultado una mayor producción de radicales superoxido al ser reducido el oxigeno a ROS; los enzimas antioxidantes como SOD2 descienden los niveles de ROS al mínimo, pero en el caso de defectos en la mitocondria, como se supone en el caso de la EP, este equilibrio se rompe y la cantidad de ROS generado por la cadena de transporte de electrones, cuya actividad está disminuida, se incrementa (41).

4.3. La enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es una alteración neurodegenerativa heredada con carácter autosómico dominante que se caracteriza por disfunción mo-

tora, emocional, demencia y alteración cognitiva progresiva. Se debe a mutaciones en el gen de Huntington por una expansión repetitiva de DNA (trinucleotido CAG) en el gen que codifica la proteína huntinina en su secuencia de codificación en el brazo corto del cromosoma 4. El gen normal tiene menos de 36 repeticiones mientras que el mutado tiene 40 o más repeticiones CAG. Dado que CAG es el codón para la glutamina, esta enfermedad se considera un desorden de la poliglutamina (42).

Existe una gran evidencia sobre el estrés oxidativo junto con la disfunción mitocondrial que pueden llevar a un déficit de energético de la misma. En el estudio al que nos referimos se identifican roturas de ADN en núcleos apoptóticos o necróticos en neuronas de las zonas corticales y estriadas comparadas con las encontradas en los grupos control. La oxidación del DNA tanto nuclear como mitocondrial produce el metabolito 8-oxo-dG. Los aumentos significativos en 8-oxo-dG del DNA nuclear provienen del núcleo caudado de las muestras procendentes de tejido post-mortem de pacientes afectos de EH y el proveniente del ADN mitocondrial del cortex parietal. Otros marcadores de daño oxidativo como hemo oxigenasa, 3-nitrotirosina y malonildialdehido se encuentran elevados en el córtex y núcleo estriado en pacientes que sufren la enfermedad comparados con muestras de personas sanas (43).

La disfunción mitocondrial está involucrada en la enfermedad de EH. El metabolismo de la glucosa está reducido en los ganglios basales y el córtex cerebral en pacientes sintomáticos e incluso en portadores asintomáticos como se ha visto en pruebas de imagen como PET (tomografía de emisión de positrones). Estudios bioquímicos han demostrado actividad disminuida de componentes importantes de fosforilación oxidativa y del ciclo del ácido tricarboxílico, incluídos los complejos II-III y la aconitasa.

Otros estudios han demostrado que mutaciones en el DNA mitocondrial pueden estar relacionadas con la patogenia de la enfermedad y que estas mutaciones pueden, a su vez ser consecuencia del daño oxidativo sobre el DNA mitocondrial. La proteína mutante se localiza en la membrana externa mitocondrial neuronal, incrementa la susceptibilidad de la mitocondria al calcio y libera citocromo-c. Se observa también un aumento de la permeabilidad de la membrana y descenso de la función mitocondrial normal. Los enzimas que controlan las especies reactivas de oxigeno quedan afectados al serlo los genes que codifican SOD1, SOD2, y GPx que dan como resultado un aumento del daño oxidativo y la muerte neuronal (40).

4.4. La Esclerosis Lateral Amiotrófica

Esta enfermedad neurodegenerativa es la forma más frecuente de enfermedad progresiva de la neurona motora que comienza generalmente en la edad adulta aunque existen algunas formas de comienzo juvenil, 5-10% de los casos son familiares con una herencia autosómica dominante.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se caracteriza por la instauración de un daño progresivo celular y muerte de neuronas motoras de la médula espinal y del cerebro. La histopatología de las células muestra la presencia de inclusiones proteicas en los cuerpos neuronales y en los axones acumulos de neurofilamentos. Los pacientes desarrollan debilidad muscular, pérdida de fuerza asimétrica de desarrollo gradual, atrofia muscular e hiperreflexia.

La patogénia de la enfermedad parece ser multifactorial (44) en la que se interconexionan factores genéticos, estrés oxidativo, excitotoxicidad, agregación proteica y daño en los procesos celulares como los producidos en las mitocondrias.

La relación del estrés oxidativo se ha establecido al comparar muestras de tejido cerebral y de líquido cefalorraquídeo en muestras post-mortem que mostraron la presencia de cambios bioquímicos que, relacionados con los efectos dañinos de los radicales libres o con su metabolismo anormal, están más aumentados en los enfermos que en los controles. La hipótesis principal de estos estudios se basó en que las mutaciones alterarían la estructura de la proteína SOD1, lo que permitiría el acceso de substratos anormales en los sitios de acción del cobre que dan como resultado radicales libres, peroxinitritos y radicales hidroxilos. La nitración de los residuos de tirosina por los peroxinitritos tiene consecuencias muy dañinas para las proteínas celulares. Algunas mutaciones en SOD1 favorecen que se produzcan variantes deficientes en zinc las cuales también hacen más accesible a los lugares de fijación del cobre a substratos anormales lo cual favorece más la muerte celular (45).

El estudio del EO en las enfermedades neurodegenerativas ha arrojado datos muy importantes sobre su mecanismo patogénico. Los productos de la modificación oxidativa de moléculas orgánicas están contribuyendo al diagnóstico y seguimiento clínico de estas enfermedades. No obstante las investigaciones futuras en esta rama de la biomedicina serán de gran ayuda para la consolidación de estos conceptos y la validación definitiva de su utilidad en la práxis médica.

5. BIBLIOGRAFÍA

(1) Halliwell, B., and Gutteridge, JMC. (2007) Free Radicals in biology and medicine. 4th Edition.Oxoford University Press.

(2) Cerdá Mico, C., Salvador Verdú, A., Ocete Mochón, M.D., Torregrosa Sánchez, R., Fandos-Sánchez, M., Sáez Tormo, G. (2009) Estrés oxidativo, envejecimiento y cáncer. En: Biogerontología médica. Coordinado por: Sastre, J. Ramón, R., Pamplona, R. Madrid. Editorial: ERGON. Depósito legal: M-22035-2009 pp. 71-85.

(3) Sáez, G.T. (2005) Biopatología de los radicales libres. En: Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías. (Ana María Pascual Leone ed.) Real Academia de Farmacia de Madrid 201-224.

(4) Salvador, A., Donderis, S., Olivares, C., Guaita, M., Espinosa, O., Rodríguez, J., Fondos, M., y Guillermo, T. Sáez. (2003) El estrés oxidativo en la patología degenerativa. Mecanismos de acción y marcadores de lesión molecular. *Revista Química Clínica*. 25: 49-57

(5) Blankenberg, S., Rupprecht, H.J., Bickel, Ch., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L. *et al*. (2003) Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med*. 349: 1605-1613.

(6) Sies, H. (1986) Bichemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem*. 25: 1058-1071.

(7) Bors, W., Michel, C. Antioxidant capacity of flavonols and gallate esters: pulse radiolysis studies. Free Radic Biol Med. 1999; 27: 1413-1426.

(8) Estruch, R., Martínez-González, M.A., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Rúiz Guitérrez, V., Covas, M.I., Fiol M., Gómez Gracia, E., López Sabater, M.C., Vinyoles, E., Arós F., Conde, M., Lahoz, C., Lapetra, J., Sáez, G., Ros, E. (2006) Effects of a Mediterranean-Style Diet on Classical and Nobel Risk Factors for Coronary Heart Disease. THE PREDIMED Study, a Randomized Controlled Feeding Trial. *Ann Intern Med* 145:1-11.

(9) Graf, B.A., Milbury, P.E., Blumberg, J.B. (2005) Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J. Med. Food* 8: 281-290.

(10) Sobratec, M.A., Bahorum, T., Auroma, O.I. (2006) Chemopreventive actinios of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors* 27: 19-35.

(11) Joseph, J., Schukitt-Hale, B., Lau, F.C. (2007) Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behaviour in senescence. *Ann NY. Acad Science* 1100: 470-485.

(12) Joseph, J., Cole, G., Head, E., Ingram, D. (2009) Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J. Neurosci* 29: 12795-12801.

(13) Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G., Gluud, C. (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297: 842-857.

(14) Brunner, E.J., Rees, K., Ward, K., Burke, M., Thorogood, M. (2007) Dietary advice for reducing cardiovascular risk. *Cochrane Database Syst. Rev* 17: CD002128.

(15) Fields, R.K. and Stevens-Graham, B. (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298: 556.

(16) Zeevalk, G.D., Bernard, L.P., Song, C., Gluck ,M., Ehrhart, J. (2005) Mitochondrial inhibition and oxidative stress; reciprocating players in neurodegeneration. *Antiox. Redox. Signal* 7: 1117-1139.

(17) Egan, M.F., Kojima, M., Callicot, J.H., Goldberg, T.E., Klachana, B.S., Bertolino, A., Zaitser, D., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., Weinberger, D.R. (2003) The BDNF va199met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hypocampal function. *Cell* 112: 257-269.

(18) Ceccatelli, S., Tamm, G., Zhang, Q., Chen, M. (2007) Mechanisms and modulation of neural cell damage induced by oxidative stress. *Physiology and Behavior* 92: 87-92.

(19) Sapolski, R.M. (1996) Why stress is bad for your brain. *Science* 273: 749-750.

(20) Epel, E.S., Blackbum, E.H., Lin, J., Dhabhar, F.S., Adler, N.E., Morrow, J.D. *et al*. (2004) Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17312-1735.

(21) Ahlbom, E., Ggvadze, V., Chen, M., Celsi, G., Coccatelli, S. (2000) Postnatal exposure to high levels of glucocorticoids increase the susceptibilty of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14726-14730.

(22) Castilla-Costanza, I., García, M., Muguerza, B., Quiroga, J., Pérez, R., Santidrián, S., *et al*. (1997) Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetracloride-induced cirrhoris. *Gastroenterology* 113: 1682-1691.

(23) Shimizu, H., Uetsuka, K., Nakayama, H., Doi, K. (2001) Carbon tetrachloride-induced acute liver injury in Mini and Wistar rats. *Exp. Toxicol Pathol* 53: 11-17.

(24) Barke, A. Is growth hormone deficiency a beneficial adapatation to aging? Evidence from experimental animals. (2003) *Trends Endocrinol Metab*. 1: 340-344.

(25) Corpas, A.P., Harman, S.M., Blackman, M.R. (1993) Human growth hormone and human aging. *Endocr. Rev*.14: 20-39.

(26) Borras, C., Sastre, J., Garcia-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, F.V., Viña, J. (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med*. 34: 546-552.

(27) Sack, M.N., Rader, D.J., Cannon, R.O. (2002) Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. Arterioscler *Thromb Vasc. Biol*. 22: 438-442.

(28) Telci, A., Cakatay, U., Akhan, S.E., Bilgin, M.E., Turfanda, A., Sirvas, A. (2002) Postmenopausal hormone replacement therapy use decreases oxidative protein damage. *Gynecol. Obstet. Invest*. 54: 88-93.

(29) Green, P.S., Simpkins, J.W. (2000) Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int. J. Dev. Neurosci*. 18: 347-358.

(30) Reiter, R.J. (2003) Melatonin: clinical relevance. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 17: 273-285.

(31) Ianas, O., Olinesku, R., Badescu, I. (1991) Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinology* 29: 147-153.

(32) Jellinger, K.A. (2003) General aspects of neurodegeneration. *J. Neural. Transm Suppl*. 65: 101-114.

(33) Cumsee, C., Landshamer, S. (2006) Molecular insights into mechanisms of cell death program: role in the progression of neurodegenerative disorders. *Curr. Alzheimer Res*. 3: 269-283.

(34) Liu, C.Y., Lee, C.F., Wei, Y.H. (2009) Role of reactive oxygen species-elicited apoptosis in the pathophysiology of mitocondrial and neurodegenerative diseases asociate with mitochondrial DNA mutations. *J. Formos Med. Assoc*. 108: 599-611.

(35) McTigue, D.M., Tripathi, R.B. (1008) The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J. Neurochem*. 107: 1-19.

(36) Hayashi (2009) Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology* 29: 1-8.

(37) Wallace, D.C. (1997) Mitochondrial DNA mutations and bioenergetic defects in aging and degenerative diseases. In *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. R.N. Rosenberg *et al*., Eds.: 237–269. Butterworth-Heinemann. Boston.

(38) Wallace, D.C.(2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39 : 359–407.

(39) Khusnutdinova, E., Giyazova, I., Ruiz-Pesini, E., Wallace, D.C. *et. al.* (2008) A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: Evidence from Parkinson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1147: 1-20.

(40) Rajnish, K., Chaturvedi, M., Flint, B. (2008) Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1147: 395-412.

(41) Zhou, Ch., Huang, Y., Przedborski, S. (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease. A mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1147,1: 93–104.

(42) Mariani, E., Polidori, M.C., Cherubini, A., Mecocci, P. (2005) Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *J. Chromatog. B.*; 827: 65–75.

(43) Stack, E.C., Matson, W.R., Ferrante, R.J. (2008) Evidence of Oxidant Damage in Huntington's Disease: Translational Strategies Using Antioxidants. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1147: 79-92.

(44) Shaw, P. (2005) Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 76: 1046-1057.

(45) Hervias, I., Beal, M.F., Mandredi, G. (2006) Mitochondrial disfunción and amyotrophic lateral Celorio. *Mucscle. Nerve* 33: 598-608.

11. Caracterización y modulación de la plasticidad del cerebro humano

ALVARO PASCUAL-LEONE*
Y
JOSÉ M.ª TORMOS MUÑOZ**

* *Catedrático de Neurologia Harvard Medical School y Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.*
** *Coordinador de Investigación, Instituto Universitario de Neurorrehabilitación Guttmann-UAB.*
Berenson-Allen Center for Noninvasive Brain Stimulation, Department of Neurology, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, MA, USA, Institut Guttmann de Neurorrehabilitacion Universitat Autónoma de Barcelona (UAB), Barcelona España.

RESUMEN

Las neuronas son estructuras muy especializadas, resistentes al cambio, integradas en redes distribuidas que experimentan cambios dinámicos a lo largo de la vida. Estos cambios en la conectividad funcional de redes neurales pueden seguirse de cambios estructurales más estables. Por lo tanto, el cerebro está continuamente sometido a una remodelación plástica. La plasticidad no es un estado ocasional del sistema nervioso, sino el estado de normalidad del sistema nervioso durante toda la vida. No es posible comprender el funcionamiento psicológico normal, ni las manifestaciones o consecuencias de la enfermedad, sin considerar el concepto de plasticidad cerebral. Cambios plásticos del sistema nervioso no necesariamente dan lugar a ventajas comportamentales. Por lo tanto, el reto es comprender los mecanismos y las consecuencias de la plasticidad para modularlos, suprimiendo unos y potenciando otros, a fin de promover cambios adaptativos en el cerebro de cada individuo. El comportamiento, la neuroestimulación y las intervenciones dirigidas con neurofármacos pueden modular la plasticidad y promover resultados deseables para cada individuo.

ABSTRACT

Neurons are highly specialized structures, resistant to change, but are engaged in distributed networks that do dynamically change over the lifespan. Changes in functional connectivity, for example by shifts in synaptic strength, can be followed by more stable structural changes. Therefore, the brain is continuously undergoing plastic remodeling. Plasticity is not an occasional state of the nervous system, but the normal ongoing state of the nervous system throughout the life span. It is not possible to understand normal psychological function nor the manifestations or consequences of disease without invoking the concept of brain plasticity. The challenge is to understand the mechanisms and consequences of plasticity in order to modulate them, suppressing some and enhancing others, in order to promote adaptive brain changes. Behavioral, neurostimulation and targeted neuropharmacologic interventions can modulate plasticity and promote desirable outcomes for a given individual.

INTRODUCCIÓN

La conducta humana está modelada por los cambios ambientales y las presiones, las modificaciones fisiológicas y las experiencias. El cerebro, por tanto, como responsable último del comportamiento en los seres humanos, debe tener la capacidad de cambiar de manera dinámica en respuesta a estímulos y demandas cambiantes. Sin embargo, las neuronas, como elementos celulares individuales, son tremendamente complejas y sus componentes se han optimado de forma exquisita, por lo que su capacidad de cambio y modificación es, necesariamente, muy limitada. Afortunadamente, estas unidades celulares altamente estables operan de manera integrada en redes neuronales que garantizan la estabilidad funcional, al tiempo que proporcionan el sustrato necesario para una adaptación rápida a demandas cambiantes. El cambio dinámico de las redes neuronales podría considerarse el invento de la evolución para que el sistema nervioso pueda escapar las restricciones de su propio genoma (y su alto nivel de especialización celular) y adaptarse de manera fluida y rápida a las presiones del medio, los cambios fisiológicos y las experiencias.

La mejor manera de representar conceptualmente la función cerebral es a partir del concepto de redes neurales distribuidas, una serie de conjuntos (nodos) de neuronas y otros elementos celulares (e.g. astrocitos) que pueden estar muy dispersos anatómicamente, pero estructuralmente interconectados, y que pueden integrarse, funcionalmente, al servicio de un comportamiento determi-

nado. Estos nodos se pueden conceptualizar como operadores que contribuyen a una determinada operación o procesamiento independientemente de la modalidad aferente que aporte la información [«cerebro metamodal», véase (1)]. Sin embargo, el procesamiento en cada nodo también podría estar definido por la propia naturaleza de los estímulos. Los estímulos cambian en función de la integración en un nodo y en una red neural distribuida, y la estructura reticular y de capas de la corteza, mediante los circuitos reaferentes, proporcionaría el sustrato para una rápida modulación de los nodos activados dentro de la red neural. Dependiendo de la demanda comportamental, los conjuntos de neuronas pueden integrarse en redes funcionales distintas mediante cambios en la importancia relativa de las conexiones (conectividad funcional y efectiva). De hecho, la secuencia temporal de las interacciones entre los elementos de una red, más allá de la integridad de las conexiones estructurales, podría ser un elemento de integración crítico para el establecimiento de una red funcional determinada y la aparición de una respuesta comportamental concreta.

Los conceptos de localización, pero de carácter multifocal, y de redes, pero cambiando dinámicamente su capacidad de respuesta en función de una demanda determinada, proporcionan un modelo conceptual actual, para solucionar la controversia clásica entre las teorías localizacionistas y equipotenciales. La función estaría definida por un patrón de activación determinado, de un conjunto de neuronas distribuidas espacialmente, pero interconectadas entre sí, en una ventana de tiempo y con un orden temporal específico. En este tipo de redes distribuidas, los nodos específicos pueden ser críticos para una comportamiento o una función determinada. El conocimiento de estos casos es útil desde el punto de vista clínico para explicar la fenomenología de los pacientes y localizar sus lesiones, pero puede llevar a una conceptualización simplista de relaciones entre cerebro y conducta. En un contexto de redes neurales dinámicas y plásticas, el comportamiento después de una lesión nunca es simplemente el resultado de la lesión, sino más bien la consecuencia del modo en que el resto del cerebro es capaz de articular la función después de esa determinada lesión. La plasticidad neural puede resultar a la ausencia de cambios perceptibles a nivel comportamental, provocar cambios demostrables sólo en condiciones especiales, o inducir cambios de comportamiento que constituyen los síntomas de una enfermedad. Podría observarse la pérdida de capacidades o funciones previamente adquiridas, la desinhibición de comportamientos normalmente inhibidos en el cerebro sano, la recuperación de la función perdida por sistemas adyacentes (aunque quizá de forma incompleta o por medio de diferentes estrategias y modelos de activación), o la aparición de nuevos comportamientos que puedan resultar adaptativos o maladaptativos para el individuo.

Por lo tanto, la plasticidad no es un estado ocasional del sistema nervioso, sino el estado de funcionamiento normal del sistema nervioso durante toda la vida. Toda teoría coherente sobre el sistema motor, sensorial o la integración cognitiva, tiene que incorporar en su marco el hecho de que el sistema nervioso experimenta cambios continuos en respuesta a modificaciones en las aferencias y en las necesidades o expectativas de respuesta. No es posible comprender las funciones psicológicas en condiciones de normalidad, o las manifestaciones o consecuencias de la enfermedad, sin invocar el concepto de plasticidad cerebral. Sin embargo, los cambios plásticos a nivel neural no siempre nos permiten predecir los cambios de comportamiento y, desde luego, no implican necesariamente la recuperación funcional y ni siquiera un cambio de la función. El desafío es aprender lo suficiente acerca de los mecanismos de plasticidad y las relaciones de correspondencia entre la actividad cerebral y el comportamiento para poder guiarlos, suprimiendo o inhibiendo los cambios que pueden conducir a comportamientos indeseables, y acelerando o potenciando los que resultan en un beneficio de comportamiento para el sujeto o paciente.

LA ACTIVIDAD DE LAS REDES NEURONALES CAMBIA DINÁMICAMENTE PARA PRESERVAR EL COMPORTAMIENTO

Mientras se mantenga una vía de salida para alcanzar la respuesta necesaria (aún cuando fuera necesario desenmascarar o facilitar la activación de vías alternativas), cambios en la actividad en la red neural distribuida pueden ser capaces de establecer nuevos patrones de activación cerebral y mantener la función, incluso a pesar de lesiones cerebrales.

Esta capacidad de cambio dinámico de las redes neurales se ilustra en el siguiente experimento (2). Pedimos a un grupo de sujetos sanos que abrieran y cerraran el puño voluntariamente a un ritmo controlado por ellos, de alrededor de un movimiento cada segundo, mientras estaban acostados en un escáner de resonancia nuclear magnética funcional (RNMf). En comparación con el reposo, la activación durante el movimiento fue significativamente mayor en la corteza motora primaria (M1) contralateral a la mano en movimiento y, rostralmente, en la corteza motora suplementaria (SMA) (Figura 1A). Modificamos la actividad de la corteza motora mediante estimulación magnética transcraneal (EMT) repetitiva, y apreciamos un cambio en el patrón de activación del cerebro mientras se mantenía la integridad de la conducta (Figura 1A). La EMT repetitiva (EMTr) de baja frecuencia (1 Hz) inhibe la actividad en el área cortical estimulada (3). Tras aplicar EMTr a 1 Hz sobre la M1 contralateral, los sujetos

eran capaces de mantener la conducta, pero mostraban mayor activación de la SMA y de la M1 ipsilateral a la mano en movimiento. Por el contrario, el aumento del nivel de excitabilidad de la M1 contralateral [por aplicación EMTr de alta frecuencia, 10 Hz, (3, 4)] se asoció con una disminución en la activación de SMA, manteniendo la misma capacidad de ejecución.

Li y cols. (5) combinando EMT y tomografía por emisión de positrones (PET) han puesto de manifiesto cambios en la conectividad córtico-cortical y córtico-subcortical subyacentes a los cambios en los patrones de activación cortical que se asocian con la preservación de la capacidad funcional cuando se produce una inhibición focal de la actividad cortical (Figura 1B). Tras la EMTr

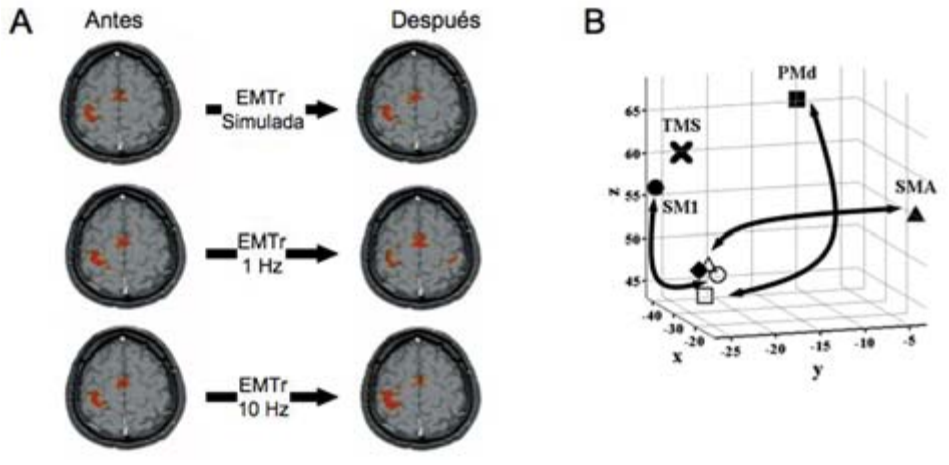


FIGURA 1. ***A.*** *Patrones de activación cerebral en un estudio de RNMf, mientras los sujetos realizaron un movimiento rítmico repetido de la mano (con control cinemático cuidadoso) antes y después de estimulación magnética transcraneal repetitiva (EMTr) de la corteza motora contralateral. Tras la EMT simulada (fila superior) no se aprecia ningún cambio significativo en la activación de la corteza motora (M1) contralateral a la mano en movimiento ni de la corteza motora suplementaria rostral (SMA). Después de la supresión de la actividad en M1 mediante EMTr a 1Hz (1600 estímulos, al 90% de la intensidad del umbral motor; fila central), hay una mayor activación de la SMA rostral y de la M1 ipsilateral a la mano en movimiento. El aumento de la excitabilidad de la M1 contralateral utilizando EMTr de alta frecuencia (20 Hz, 90% de la intensidad del umbral motor, 1600 estímulos; fila inferior), muestra una disminución en la activación de la SMA rostral.*
B. *Modificado de (Lee et al., 2003). Áreas del cerebro que muestran distintas respuestas y distintos patrones de relación correspondientes a un determinado movimiento después de EMT. Los símbolos de círculo, cuadrado, triángulo indican sitios en la corteza motora primaria (símbolos abiertos) que están relacionados de forma más estrecha a la actividad en la corteza sensoriomotora (SM1), la corteza premotora dorsal (PMD), y la corteza motora suplementaria (SMA) durante una tarea de movimiento de los dedos después de la EMT. La X marca el lugar de estimulación con EMTr a 1 Hz.*

la capacidad de ejecución motora se mantuvo sin cambios mientras se observó un incremento del flujo sanguíneo cerebral regional (FSCr) relacionado con la tarea sobre la corteza M1 estimulada y sobre la corteza premotora dorsal. El análisis de la conectividad demostró que, después de EMT, se produce una remodelación del patrón de activación del sistema motor, aumentando la conectividad relacionada con el movimiento entre SMA y la corteza premotora y localizaciones de la corteza sensoriomotora primaria.

Así, frente a la interrupción artificial y focal de la actividad cerebral, el desempeño de una tarea relativamente simple se puede mantener mediante una rápida redistribución operacional de las representaciones, el reclutamiento de las áreas cerebrales adicionales y cambios dependientes de la tarea relativos a la coherencia córtico-cortical y córtico-muscular (5-8). Sin embargo, en circunstancias distintas, la modulación focal de la actividad, en un nodo de la red neural distribuida, puede dar lugar a cambios en el comportamiento de manera controlada y específica. Por ejemplo, una lesión parietal derecha puede dar lugar a un cuadro de negligencia espacial (la incapacidad de atender a estímulos del espacio contralesional), pero más interesante todavía, la negligencia puede desaparecer de forma instantánea, después de una segunda lesión en la corteza frontal izquierda (9) (Figura 2A). Este efecto paradójico de una lesión cerebral (10), resultando en una mejoría en el comportamiento, es coherente con los estudios en animales por Sprague (11) y más tarde Payne y Lomber (12). Habida cuenta de la inhibición interhemisférica recíproca y el vínculo propuesto con la función de la atención, la supresión de actividad en la corteza parietal puede conducir a la negligencia contralateral, pero, al mismo tiempo, la inhibición de las estructuras que participan en la competencia interhemisférica podría conducir a una habilitación funcional en el hemisferio opuesto, que podría resultar en un aumento mensurable de la capacidad funcional del mismo lado. De hecho, Hilgetag y cols. (13) han proporcionado datos experimentales que refuerzan estas ideas. Los sujetos normales tenían que detectar pequeños estímulos rectangulares, presentados brevemente en un monitor de ordenador, de forma unilateral, en la periferia de la pantalla, a la izquierda o a la derecha, o bilateralmente en ambos lados. Evaluaron la capacidad de detección espacial antes e inmediatamente después de un tren de diez minutos de EMTr, a 1 Hz, sobre: (a) la corteza parietal derecha, (b) la corteza parietal izquierda, (c) la corteza motora primaria derecha, y (d) estimulación simulada. Hilgetag y cols. observaron un fenómeno de extinción claro para los estímulos presentados contralateralmente al hemisferio estimulado (corteza parietal derecha o izquierda). Sin embargo, el déficit se acompañó por una mayor detección de los estímulos unilaterales presentados en el lado del hemisferio esti-

mulado en comparación con el valor basal (Figura 2B). Ninguna de las condiciones experimentales control mostró efecto alguno de la estimulación sobre la capacidad de detección. Estas ideas se pueden trasladar a pacientes con lesiones parietales con síndrome de negligencia, en los que la EMTr sobre el hemisferio no lesionado (a menudo el izquierdo) puede aliviar los síntomas de hemi-inatención (14, 15).

Así pues, la actividad en las redes neurales se puede modular dinámicamente y esto lo podemos ilustrar mediante las adaptaciones neurofisiológicas

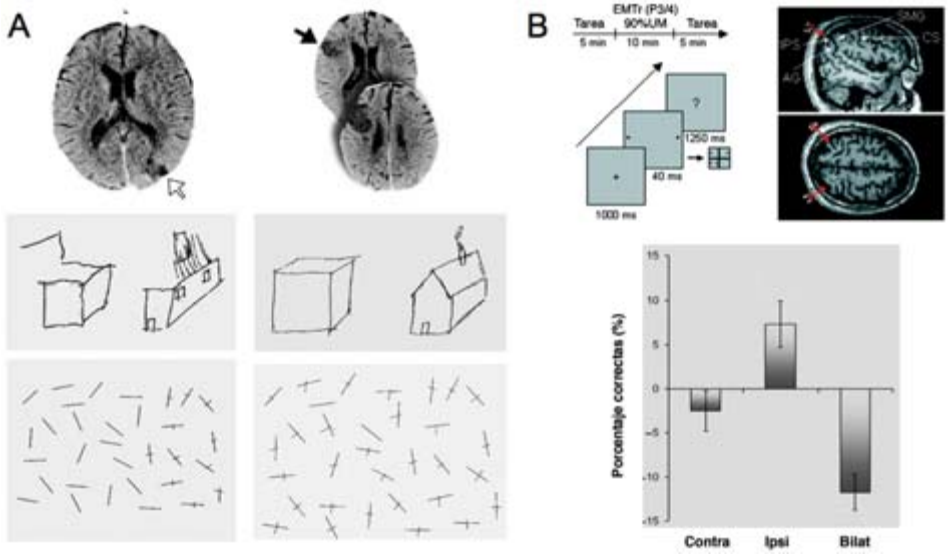


FIGURA 2. ***A.*** *Modificado de (Vuilleumier et al., 1996). Apreciación de la negligencia en la elaboración de la casa y en las tareas de cancelación de líneas (izquierda), debido a un ictus hemorrágico parietal derecho (flecha abierta). Los síntomas de la negligencia se resolvieron de forma aguda (panel derecho), como consecuencia de un segundo ictus en la corteza frontal izquierda (flecha sólida).*

B. *Modificado de (Hilgetag et al., 2001). Impacto de la EMTr guiada por imagen sobre la corteza parietal derecha en una tarea de detección de estímulos visuales. Durante la tarea se presentaron estímulos visuales cuidadosamente calibrados a la derecha, a la izquierda o bilateralmente en un monitor de ordenador (arriba izquierda) y los sujetos tenían que responder pulsando el botón de respuesta adecuada (derecha, izquierda o ambos). Se aplicó EMT guiada por estudios anatómicos de resonancia magnética de cada sujeto mediante un sistema estereotáxico sin marco (arriba derecha). Se observó una disminución en el rendimiento contralateral (negligencia), junto a un aumento aún mayor en el rendimiento ipsilateral a la aplicación de EMTr parietal (parte inferior). A esto, se unió una disminución significativa de la detección de estímulos bilaterales, donde los sujetos no atendían el estímulo contralateral y respondían como si sólo se hubiese presentado el ipsilateral (extinción de la estimulación simultánea doble).*

del cerebro a lesiones focales. El resultado comportamental, sin embargo, no se correlaciona de una manera predeterminada a los cambios de actividad en las redes distribuidas. Así, cambios en la actividad de la red pueden no dar lugar a ningún cambio conductual, ocasionar una mejora del comportamiento o la aparición de un déficit. Con frecuencia, el concepto ampliamente extendido de que el cerebro optima su funcionamiento para mejorar la conducta no es correcto, ya que implica, por ejemplo, que una lesión en el cerebro siempre dará lugar a una pérdida de función. De hecho, hemos visto que este postulado podría verse cuestionado desde una concepción del cerebro dotado de plasticidad dinámica.

Es importante reconocer que en cualquier caso, el alcance de posibles cambios dinámicos a través de una red neural determinada está definido por las conexiones existentes. Los elementos neuronales existentes y los posibles patrones iniciales de conectividad dependen del desarrollo cerebral controlado genéticamente. Considerando la variabilidad genética interindividual, y los diferentes sustratos cerebrales, los mismos hechos en diferentes personas tendrán consecuencias distintitas, en tanto en cuanto los mecanismos de plasticidad cerebral actuaran sobre sustratos neurales individualmente distintos. Del mismo modo, dentro de cada individuo, las diferencias entre las redes neurales (por ejemplo, el sistema visual, sistema auditivo, o el sistema del lenguaje) también condicionan el alcance de los cambios plásticos (16, 17). Los cambios plásticos en todos los sistemas del cerebro varían en función de las diferencias en los patrones de conexión existentes y en los factores de control molecular y genético, a través de los sistemas cerebrales, que definen el alcance, magnitud, estabilidad y cronometría de la plasticidad.

LOS CAMBIOS DINÁMICOS DE LA RED DAN PASO A CAMBIOS PLÁSTICOS MÁS ESTABLES

Los cambios rápidos en las redes neurales en respuesta a las influencias ambientales (por ejemplo, los cambios dinámicos de la actividad de las conexiones ya existentes a través de redes neurales distribuidas, los cambios en la coherencia córtico-cortical y córtico-subcortical dependientes de la tarea, o la modificación de la correspondencia entre el comportamiento y la actividad neuronal) pueden preceder al establecimiento de nuevas conexiones a través del crecimiento y cambios en las arborizaciones dendríticas resultando en cambios estructurales y en el establecimiento de nuevas vías.

Estas dos etapas del fenómeno de la plasticidad se ilustran en el siguiente experimento (18). A un grupo de sujetos normales se les enseñó a hacer ejercicios de cinco dedos, con una mano sobre un teclado de piano, conectados a un ordenador a través de una interfaz musical. Se les instruyó para realizar la secuencia de movimientos de los dedos con soltura, sin pausas, y sin saltarse ninguna nota, prestando especial atención a mantener el intervalo constante entre cada una de las notas y la duración de cada pulsación. Un metrónomo marcaba un ritmo de 60 pulsaciones por minuto y se les pidió a los participantes que ejecutaran el ejercicio siguiendo la retroalimentación auditiva. Los sujetos fueron estudiados en cinco días consecutivos, y cada día realizaban una sesión de dos horas de entrenamiento seguida de una evaluación. La evaluación consistía en la ejecución de 20 repeticiones del mismo ejercicio de cinco dedos. El número de errores en la secuencia, y la duración, la precisión y la variabilidad de los intervalos entre la pulsación de las notas (marcado por el metrónomo) mejoró significativamente en el transcurso de los cinco días. Antes de la primera sesión de entrenamientos, en el primer día de la prueba, y después de cada sesión, se utilizó EMT para generar un mapa de la representación cortical, bilateral, de los movimientos del flexor largos de los dedos y de los músculos extensores. En la medida que mejoró la ejecución de la tarea, se observó una disminución en el umbral de activación por EMT del flexor de los dedos y de los músculos extensores, de manera progresiva. Aun teniendo en cuenta este cambio en el umbral, el tamaño de la representación cortical para ambos grupos musculares aumentó significativamente (Figura 3a, Jornada 1). Aún más interesante, este aumento del tamaño de la representación cortical sólo pudo ser demostrado cuando los estudios de mapeo cortical se llevaron a cabo poco después de la sesión de ejercicios, pero ya no al día siguiente, después de una noche de descanso y antes de la sesión de entrenamiento del día siguiente. Resulta interesante que estos cambios plásticos, incluso los más tempranos, relacionados con la experiencia y el entrenamiento, parecen críticamente regulados por factores genéticos. Kleim y cols. (19) utilizaron EMT para mapear las proyecciones motoras y mostraron que los cambios dependientes del entrenamiento, tanto en los potenciales motores evocados, como en la representación de movimientos en la corteza motora, estaba reducido en sujetos con un polimorfismo val66met en el gen del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), en comparación con los sujetos sin el polimorfismo (Figura 3b).

Una vez alcanzado el nivel de rendimiento cercano a la perfección, al final de una semana de entrenamiento diario, los sujetos continuaron practicando diariamente el mismo ejercicio de piano durante las cuatro semanas siguientes (Grupo 1) o dejaron de practicarlo (Grupo 2) (20). Durante las cuatro semanas de

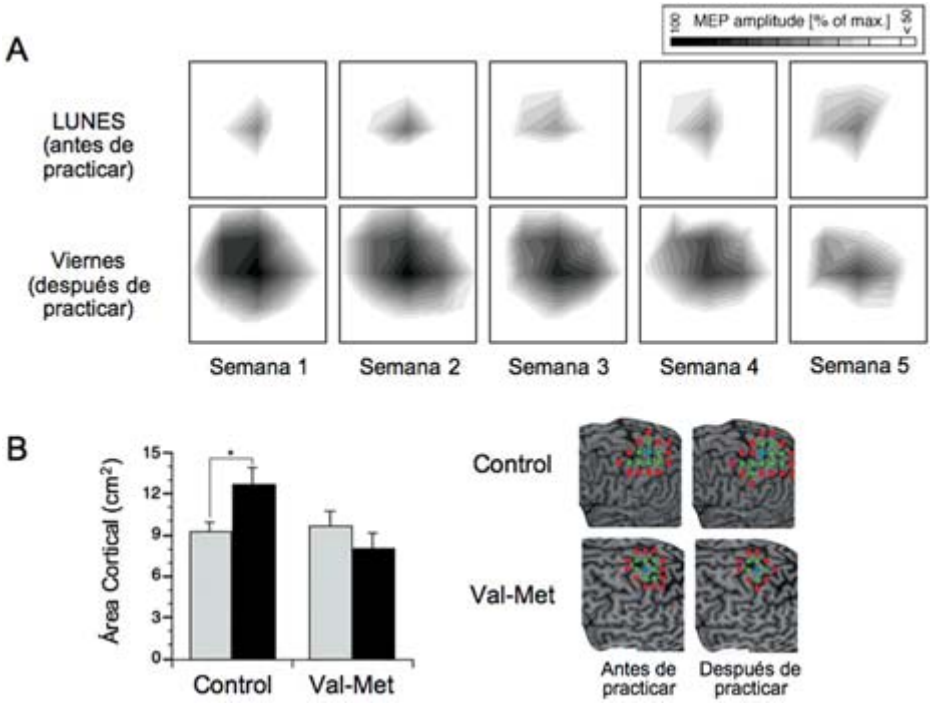


FIGURA 3. ***A.*** *Modificado de (Pascual-Leone, 1996; Pascual-Leone et al., 1995). Mapas de la actividad cortical de los músculos flexores de los dedos durante la adquisición de un ejercicio de cinco movimiento de los dedos sobre un piano. Se observan cambios relevantes en los mapas de representación cortical de los músculos flexores de la mano entrenada, a lo largo de las cinco semanas de entrenamiento diario (de lunes a viernes). Téngase en cuenta que pueden diferenciarse dos fenómenos, uno mostrando la modulación rápida de los mapas de lunes a viernes y el otro ilustrando cambios más lentos y más discretos en los mapas de cada lunes, a lo largo de todo el proceso.*
B. *Modificado de (Kleim y cols. 2006). Histograma que muestra el tamaño de los mapas de la representación cortical antes (barras grises) y después del ejercicio (barras negras) en los sujetos control y en sujetos con un polimorfismo de val66met de BDNF (lado izquierdo). Después del ejercicio, los sujetos control tenían representaciones significativamente mayores que en el momento basal, mientras que los sujetos con un alelo Met no se observó un cambio significativo. Esto se ilustra con los mapas de representación motora superpuestos, de la condición de control y del polimorfismo Val-Met, en una combinación de imágenes de resonancia magnética del cerebro de la corteza (lado derecho). Los sitios de los que la EMT evocó respuestas objetivas en el músculo están marcados en verde, los sitios negativos están marcados en rojo.*

seguimiento (Figura 3a, Semanas 2-5), se obtuvieron mapas de la representación cortical de los movimientos de los músculos flexores y extensores de los dedos todos los lunes (antes de la primera sesión de entrenamientos de cada semana en el Grupo 1) y los viernes (después de la última sesión de práctica para

la semana en el Grupo 1). En el grupo que continuó practicando (Grupo 1), los mapas de la actividad cortical obtenidos el viernes mostraron un pico de crecimiento inicial y, finalmente, una disminución lenta de tamaño, a pesar de la mejora del rendimiento continuo. Por otro lado, los mapas obtenidos el lunes, antes de la sesión de entrenamiento y tras el descanso del fin de semana, mostraron un pequeño cambio desde la línea de base, con una tendencia a aumentar de tamaño durante el transcurso del estudio. En el grupo 2, los mapas volvieron al tamaño inicial después de la primera semana de seguimiento y se mantuvieron estables desde ese momento.

Este experimento muestra dos fases distintas de la modulación de los mapas corticales de representación del movimiento. La primera, la evolución rápida en el tiempo en la modulación inicial de la representación cortical del movimiento, por lo que una cierta región de la corteza motora puede aumentar su influencia de forma reversible sobre una población de motoneuronas, lo que es más compatible con el desenmascaramiento de conexiones existentes con anterioridad. Apoyando esta idea, los cambios iniciales son muy transitorios: demostrables después del entrenamiento, pero volviendo a los valores basales después del descanso durante el fin de semana. En la medida en que la tarea se convierte en sobreaprendida, en el curso de las cinco semanas, se observa un cambio decreciente en el patrón de activación de la corteza para mantener la ejecución óptima de la tarea, mientras otras estructuras, dentro del sistema nervioso, pasan a tener un papel más destacado en la ejecución de la misma. La modulación flexible, a corto plazo, de la actividad de vías existentes representa un primer paso necesario, previo a los cambios estructurales, a más largo plazo, en las redes intracorticales y subcorticales, a medida que las habilidades se convierten en sobreaprendidas y automáticas. Un número creciente de estudios de neuroimagen sugieren la existencia de dos pasos diferenciados (21-25), y estudios en animales apoyan la idea de los procesos diferenciados e implicados, a lo largo del tiempo, en la adquisición temprana y posterior consolidación del aprendizaje de habilidades (26).

DOS MECANISMOS COMPLEMENTARIOS EN EL CONTROL DE LA PLASTICIDAD

Hemos visto que los cambios en redes neurales dinámicas pueden conducir a cambios plásticos más estables, que incluyen la plasticidad sináptica, así como la arborización dendrítica y la remodelación de la red. Estos cambios pueden ser conceptualizados como el resultado de un equilibrio entre dos mecanismos

complementarios - uno promoviendo y el otro limitando la plasticidad (Figura 4). Ambos mecanismos son críticos para asegurar que se forman las sinapsis necesarias y se eliminen aquellas que resultan innecesarias con el fin de optimizar los sistemas funcionales necesarios para la cognición y el comportamiento. Aunque los mecanismos moleculares que contribuyen a la plasticidad son numerosos y complejos, los mecanismos promotores de la plasticidad parecen ser críticamente dependientes de la neurotrofina BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) (27), mientras que los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I parecen estar implicados en los mecanismos limitantes de plasticidad (28, 29).

A nivel sináptico, los mecanismos de potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) implican una serie de procesos de inducción y de consolidación que dependen de varios cambios estructurales y que pueden ser modificados, facilitados o suprimidos, por distintas influencias moduladoras (30). La LTP se inicia por la entrada de calcio a través de receptores de gluta-

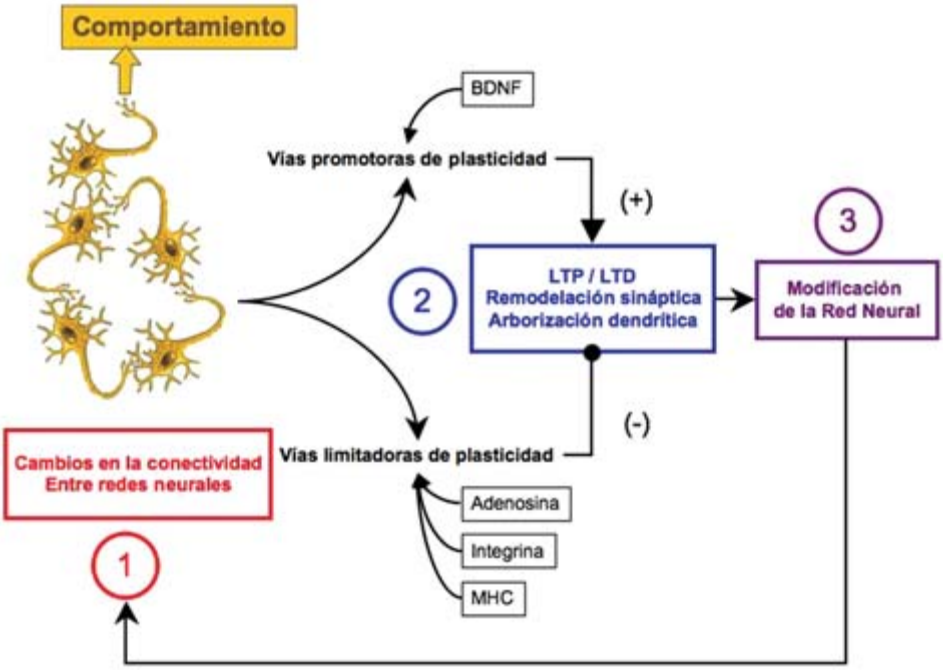


FIGURA 4. *Mapa conceptual del modelo de plasticidad expresado como el equilibrio entre los mecanismos promotores y limitantes de plasticidad, dependientes de diferentes neuromoduladores.*

mato en la densidad postsináptica. Las quinasas y proteinquinasas activadas por calcio desmontan el citoesqueleto, compuesto de filamentos de actina entrecruzados con espectrina y otras proteínas, que normalmente mantienen la forma de las espinas dendríticas. De este modo, las espinas se vuelven más redondeadas y cortas, ampliando de forma efectiva la superficie de la densidad postsináptica, que puede aceptar un mayor número de receptores de glutamato y proporcionar un mejor acceso a las proteínas que mejoran el flujo de corriente a través de los receptores. En paralelo, la señalización desde los receptores de adhesión, en particular las integrinas, y los receptores de moduladores, en particular BDNF, inducen la polimerización rápida de actina y la formación de un nuevo citoesqueleto. Esta polimerización de filamentos de actina consolida la nueva morfología de la espina dendrítica y de este modo la LTP. A pesar de la complejidad de este proceso, y las numerosas moléculas implicadas, el BDNF parece ser el potenciador más potente de la plasticidad descubierto hasta el momento, jugando un papel fundamental en la consolidación de LTP en múltiples regiones cerebrales. Se ha demostrado que el BDNF facilita la LTP en la corteza visual (31) y el hipocampo (32). En las sinapsis CA1, una estimulación tetánica débil, lo que en sí mismo sólo induciría a corto plazo la potenciación de baja magnitud, lleva a una LTP intensa si se combina con BDNF (33). Durante el entrenamiento motor, los niveles de BDNF están elevados en la corteza motora (34) y en seres humanos que tienen un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen (val66met) de BDNF se observa una reducción de la plasticidad dependiente de la experiencia en la corteza motora tras una tarea motora ejecutada voluntariamente (19).

Por otra parte, la adenosina (35) y ligandos de las integrinas (36) bloquean la LTP al interrumpir la polimerización de la actina y la consolidación de la LTP. En esta misma línea argumental, en un cribado de genes implicados en el desarrollo normal y la remodelación de la conectividad neuronal dependiente de la actividad reveló una región de ADN, más conocido por su papel en la regulación del sistema inmunitario, llamado complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC clase I) (37). Estudios más recientes sugieren que los genes MHC de clase I son parte integrante de una vía limitante de cambios plásticos ligados a la experiencia (38). Estos moduladores negativos de la plasticidad sináptica son muy necesarios. El establecimiento y fortalecimiento de nuevas sinapsis es una parte importante de la plasticidad del desarrollo, pero esto tiene que ir acompañado de fenómenos regresivos, incluyendo el debilitamiento y eliminación de conexiones sinápticas inapropiadas a partir de la experiencia. Sin estos fenómenos regresivos, las sinapsis superfluas pueden persistir y podrían afectar el desarrollo neurológico normal.

Por lo tanto, distintos moduladores, incluyendo BDNF, por un lado y la adenosina o los genes MHC de clase I, por otro, tienen funciones complementarias que conducen al desarrollo y la modulación rápida de los circuitos funcionales a lo largo de todo el cerebro. Estos sistemas dinámicos encierran un riesgo potencial implícito, de modo que la alteración de estas vías y de su equilibrio relativo podría conducir a estados patológicos graves. Por otro lado, la existencia de vías opuestas ofrecen la oportunidad de diseñar intervenciones y, de este modo, guiar los fenómenos de plasticidad en beneficio de cada persona.

PLASTICIDAD Y GENÉTICA

La plasticidad neuronal podría considerarse como una «invención de la evolución» para permitir que el sistema nervioso pueda escapar a las restricciones de su propio genoma (y su especificación celular altamente especializada), y así adaptarse a las presiones del medio, los cambios fisiológicos y las experiencias. En cierto sentido, la conceptualización de un punto de partida determinado genéticamente y posteriormente cambios plásticos impulsados por fenómenos ambientales y comportamentales es una reminiscencia del debate sobre el papel relativo de «naturaleza versus educación», que sigue sin resolverse en muchos campos de estudio, desde la pedagogía a la conducta animal o los trastornos neurodegenerativos. Los puntos de vista están polarizados frecuentemente, en lugar de explorar las maneras en que ambas partes juegan papeles críticos y complementarios. Los defensores de la «naturaleza», sostienen que los atributos humanos están única y principalmente condicionados por la genética, en oposición de los que creen que las influencias ambientales y la experiencia determinan las diferencias individuales. Argumentos similares a los esgrimidos en relación con la adquisición de habilidades, el idioma, o los estilos cognitivos se aplican también a la patología humana. A menudo, en el debate sobre la enfermedad se utilizan los términos «genético» frente a «ambientales», pero la implicación es la misma que en el debate «naturaleza» frente «educación». Los trastornos que se consideran fundamentalmente genéticos son aquellos en los que la presencia o ausencia de mutaciones genéticas son el principal determinante de la enfermedad, independientemente de las circunstancias ambientales. Una enfermedad considerada principalmente ambiental es aquella en que personas con cualquier carga genética pueden desarrollar la enfermedad, con la condición de haber estado expuestos al factor o factores ambientales necesarios. Sin embargo, para muchos trastornos, el riesgo está fuertemente influido por facto-

res tanto genéticos como ambientales. Por ejemplo, un gen de susceptibilidad pueden influir fuertemente en el riesgo de desarrollar una enfermedad sólo en respuesta a una exposición ambiental específica. Si la exposición al agente ambiental se produce con poca frecuencia, el gen va a ser de baja penetrancia, y puede parecer que la exposición ambiental es el principal determinante de la enfermedad, aunque el gen es necesario para desarrollar la enfermedad. Por lo tanto, aun cuando los agentes ambientales pueden tener un papel causal importante en una determinada enfermedad, esto no excluye la posibilidad de que los factores genéticos también desempeñen un papel importante, en particular las mutaciones genéticas con baja penetrancia.

Del mismo modo, las características individuales están determinadas por una combinación necesaria entre naturaleza y educación. Podríamos considerar los factores genéticos como el lienzo sobre el que los agentes ambientales ejercen su influencia. Si es así, aunque algunos factores ambientales solos (sin tener en cuenta los factores genéticos) y determinados factores genéticos aislados (independientemente de las influencias ambientales) puedan explicar algunos comportamientos y estados patológicos, en la mayoría de casos se requiere la interacción de factores genéticos y ambientales.

La sordera por toxicidad de los aminoglucósidos es un ejemplo particularmente claro de esta interdependencia y proporciona una sencilla ilustración de las circunstancias que acontecen en los modelos complejos. La exposición prolongada a los aminoglucósidos es tóxica para las células cocleares. Sin embargo, una mutación en el nucleótido 1555 del gen 12S del RNA mitocondrial de los ribosomas está asociada con una susceptibilidad muy alta a la sordera inducida por aminoglucósidos, incluso a niveles de exposición que no son tóxicos para la mayoría de los individuos (39-41). En la mayoría de los casos, la mutación no causa sordera, sin exposición a aminoglucósidos. La «penetración» de esta mutación depende, por lo tanto, de la frecuencia con que los individuos están expuestos a un antibiótico aminoglucósido. Si la exposición a antibióticos aminoglucósidos fuese rara, entonces la mutación habría tenido una baja penetrancia, y el papel fundamental de esta mutación en la determinación de la susceptibilidad a la sordera no sindrómica podría ser difícil de reconocer. Del mismo modo, en los comportamientos complejos, rasgos de personalidad y en una gran mayoría de los trastornos neuropsiquiátricos, uno o varios genes pueden marcar una susceptibilidad a ciertos factores ambientales, experiencias, impulsos aferentes, eferentes o demandas, que se traduce en cambios plásticos que, en última instancia, definen las características personales o constituyen manifestaciones de la enfermedad.

LA PLASTICIDAD COMO LA CAUSA DE LA ENFERMEDAD

La distonía focal de la mano (42) podría ser un buen ejemplo de las consecuencias patológicas de la plasticidad que puede ser inducida a partir de la predisposición genética, como la DYT-1. Es importante destacar, sin embargo, que la mera inducción de cambios plásticos no es suficiente para generar un estado de discapacidad. Se han observado cambios plásticos similares en pacientes con distonía focal y en músicos profesionales (42, 43). Además, los músicos pueden desarrollar una distonía focal de la mano (44) y la fisiopatología subyacente parece ser ligeramente diferente a la de otras formas de distonía, como el calambre del escribiente (45). Tal vez, la práctica «defectuosa» o una demanda excesiva en la presencia de determinados factores predisponentes pueden inducir una reorganización cortical no deseada y conducir a la enfermedad. Parece claro, sin embargo, que los cambios plásticos en el cerebro no implican, necesariamente, un impacto concreto en el comportamiento. Cambios similares se pueden asociar con ventajas comportamentales (como en los músicos profesionales) o con una discapacidad neurológica (como en el caso de la distonía focal), presumiblemente sobre la base de la influencias moduladoras desde la actividad de la red neuronal distribuida.

Los síndromes de dolor neuropático crónico también se postulan como un ejemplo de las consecuencias «patológicas» de la plasticidad (46-48). El tinitus puede ser el resultado de la plasticidad en el sistema auditivo inducido por estímulos anormales desde la cóclea (49). La esquizofrenia, la depresión, el trastorno de estrés postraumático y el trastorno de atención con hiperactividad son situaciones que, en parte, podrían representar manifestaciones patológicas de plasticidad cerebral (50-52). La adicción a las drogas y las conductas adictivas en general, se argumentan como ejemplos de trastornos relacionados con la plasticidad (53, 54). La enfermedad de Alzheimer parece estar vinculada a la plasticidad sináptica anormal que puede, de hecho, constituir un primer paso crucial en la patogénesis de la enfermedad (55). El autismo puede ser otro ejemplo de trastorno mediado por alteraciones de la plasticidad: los factores genéticos pueden dar lugar a una predisposición de tal manera que la plasticidad dependiente del desarrollo (posiblemente controlada por reguladores alterados) desencadena comportamientos patológicos complejos que afectan a las interacciones sociales, la adquisición del lenguaje, o el procesamiento sensorial (56).

Por lo tanto, la conducta humana y las manifestaciones de las enfermedades humanas están definidas, en última instancia y en gran medida, por la plasticidad del cerebro. Una substrato neurológico inicial, determinado genética-

mente, se modifica por cambios plásticos durante el desarrollo y las interacciones ambientales. Los procesos de plasticidad neural pueden ser normales en si mismos, pero actuar sobre un sistema nervioso anormal, como consecuencia de factores ambientales o genéticos específicos. Alternativamente, los mecanismos de plasticidad pueden ser anormales en sí mismos, agravando, posiblemente, las consecuencias de un sustrato anormal de base, determinado genéticamente o por daños ambientales. En cualquier caso, las intervenciones para guiar la conducta o el tratamiento de la sintomatología podrían tener un impacto más temprano sobre el comportamiento y, por lo tanto, ser más eficaces, si contemplan la posibilidad de modular los mecanismos reguladores de la plasticidad, que si se centran en abordar las predisposiciones genéticas subyacentes, de forma aislada.

El síndrome de X frágil proporciona un buen ejemplo de esas nociones (57-59). La mutación genética responsable del síndrome X frágil, FMR1, conduce a la ausencia de la proteína codificada FMRP. La FMRP parece desempeñar un papel importante en la plasticidad sináptica por la regulación de LTD mediante receptores metabotrópicos dependientes de glutamato. Así, en ausencia de FMRP hay un exceso de LTD ligado a la experiencia. Modelos de ratón con el síndrome X frágil también han mostrado alteraciones en la LTP, posiblemente como resultado de un desarrollo inmaduro de las espinas dendríticas. Sin embargo, la aplicación de BDNF a los cortes histológicos de cerebros de ratones transgénicos con bloqueo de FMR1 restaura completamente la actividad LTP (60) y por lo tanto podría ser útil para normalizar la función cognitiva y la conducta en pacientes con Síndrome X Frágil, 'normalizando' farmacológicamente los mecanismos alterados de plasticidad.

LA PLASTICIDAD, COMO UNA OPORTUNIDAD PARA INTERVENIR

Considerar la plasticidad como una capacidad del cerebro que puede ser activada en respuesta a un insulto para promover la recuperación funcional o compensar la pérdida de una función es un concepto erróneo. En verdad, la plasticidad es una constante en el funcionamiento del sistema nervioso y es poco probable, por tanto, que su misión principal sea hacer frente a la lesión. Presumiblemente, el sistema nervioso es intrínsecamente plástico, como se indicó anteriormente, para adaptarse y hacer frente a los desafíos de un ambiente continuamente cambiante. Las condiciones del medio pueden cambiar de manera imprevisible en el momento de la concepción de la persona, por lo que los me-

canismos para hacer frente a estos cambios no se pueden anticipar y tampoco pueden estar previstos en los atributos genéticos.

Si consideramos el cerebro como un sistema intrínsecamente plástico, la plasticidad no tiene que considerarse como un recurso para hacer frente a una lesión cerebral. Es importante destacar que la naturaleza plástica del cerebro proporciona, después de una lesión, el riesgo de cambiar de manera inadecuada y la perpetuación de los déficit, pero también una oportunidad para la intervención y la superación de los síntomas.

A raíz de una lesión cerebral, la conducta resultante (ya sea normal o presente manifestaciones patológicas relacionadas con la lesión) sigue siendo la consecuencia del funcionamiento de todo el cerebro, y por lo tanto la consecuencia de un sistema nervioso plástico. En última instancia, los síntomas no son la manifestación de la región lesionada, sino más bien la expresión de los cambios plásticos en el resto del cerebro. En la medida que existan vías eferentes que puedan vehicular la expresión de una respuesta comportamental, las interacciones córtico-corticales y córtico-subcorticales modularán sus contribuciones relativas a la red funcional, con el objetivo de establecer un mapa de activación adecuado del cerebro buscando la respuesta comportamental deseada. Conceptualmente, sería útil pensar en una serie de procesos que tienen lugar después de una lesión cerebral, y que podrían conducir a la restauración de la función, que se instauran parcialmente de forma paralela, pero con patrones temporales distintos. Cambios plásticos iniciales tienen como objetivo minimizar el daño. Subsiguientemente puede haber una mejoría funcional rápida, probablemente disfuncional, pero sin daño asociado, en la medida que algunos elementos neuronales se recuperan al impacto inicial de la lesión y se resuelven los procesos de penumbra. Después, algunas estructuras nerviosas, dañadas parcialmente pueden ser reparadas con relativa rapidez, contribuyendo así a la mejoría funcional precoz. Procesos posteriores, una vez que se ha establecido el daño final, implican volver a aprender (en lugar de recuperar) funciones y pueden seguir un proceso de dos pasos: desenmascarar y fortalecer vías de patrones de activación neuronales existentes y, finalmente, el establecimiento de nuevos cambios estructurales. En todas estas etapas de la adaptación plástica, la neuroestimulación y las intervenciones guiadas farmacológicamente podrían ayudarnos a guiar los procesos neurales y promover la adaptación, optimizando el resultado final para cada individuo.

Consideremos, por ejemplo la recuperación de la función motora de la mano después de un ictus (61-64). Después del infarto cerebral, hay un aumento en la excitabilidad del hemisferio no afectado, presumiblemente debido

a la una reducción de la inhibición transcallosa desde el hemisferio dañado y un mayor uso del hemisferio intacto. Por ejemplo, en pacientes con ictus corticales, se reduce la inhibición intracortical y aumenta la facilitación intracortical en el hemisferio no afectado (65). Además, la inhibición interhemisférica de la corteza motora afectada sobre la no afectada, en el proceso de generación de un movimiento voluntario, está también alterada (66), y este desequilibrio de excitabilidad interhemisférica se correlaciona inversamente con el tiempo desde el momento del ictus (67). En la fase aguda después de un ictus, el aumento de la inhibición sobre el hemisferio dañado tiene sentido si consideramos esta manifestación como un intento de controlar la actividad neuronal perilesional, reducir la demanda de oxígeno y la glucosa en la zona de penumbra insquémica, y por lo tanto limitar la extensión de la lesión. Sin embargo, después de la fase aguda, y una vez que la lesión es estable, las aferencias excitadoras a la zona perilesional parecen ser la mejor opción para maximizar la capacidad de recuperar las neuronas preservadas en el tejido lesionado e impulsar la capacidad de dar respuestas funcionales. Si es así, tras la fase aguda, se podría esperar un cambio de las interacciones interhemisféricas (y algunas intrahemisféricas), pasando de inhibidoras a excitadoras. En caso de que este cambio no se produzca, el resultado funcional podría no ser el deseable, con una recuperación limitada de la capacidad funcional, debido, en parte, a la persistencia de las aferencias inhibidoras de áreas intactas al hemisferio lesionado. De hecho, algunos estudios de neuroimagen demuestran que, a largo plazo, la activación persistente de la corteza ipsilateral durante tareas motoras se asocia con una menor recuperación de la función motora, mientras que una buena recuperación de la función se asocia con una disminución de la actividad en las zonas intactas y un aumento de actividad de la corteza sensoriomotora primaria del hemisferio afectado (68-70). Si es así, la estrategia de la neuromodulación inhibitoria del hemisferio intacto podría ser útil para limitar las lesiones y promover la recuperación después de un ictus. Por ejemplo, la supresión de la corteza motora ipsilateral mediante EMTr de baja frecuencia puede mejorar la función motora en pacientes estables después de la fase aguda de un ictus (Figura 5). En un grupo de pacientes, de 1 a 2 meses de evolución tras un ictus, Mansur *et al*. (71) aplicaron EMTr, a 0,5 Hz, durante 10 min, en el hemisferio intacto, para suprimir la actividad cortical y, de este modo, liberar el hemisferio dañado de la inhibición transcallosa supuestamente excesiva. Los resultados de este estudio apoyan la idea de que la hiperactividad del hemisferio sano (hemisferio ipsilateral) puede dificultar la recuperación de la función de la mano, y la neuromodulación puede ser una estrategia terapéutica para acelerar esta recuperación. Sin embargo, Werhahn *et al*. (72) realiza-

ron un estudio similar para evaluar los efectos de la modulación de la EMTr a 1 Hz sobre el hemisferio no afectado en pacientes con mano parética, encontrando resultados distintos. En ese estudio, la EMTr a 1 Hz sobre el hemisferio sano, no afectó la capacidad de ejecución de la mano parética para realizar un ejercicio de pulsión con un dedo, en una muestra pequeña de cinco pacientes, con más de un año de evolución después de un ictus. Estos datos sugieren que el tiempo transcurrido desde la lesión cerebral podría ser una variable importante a tener en cuenta.

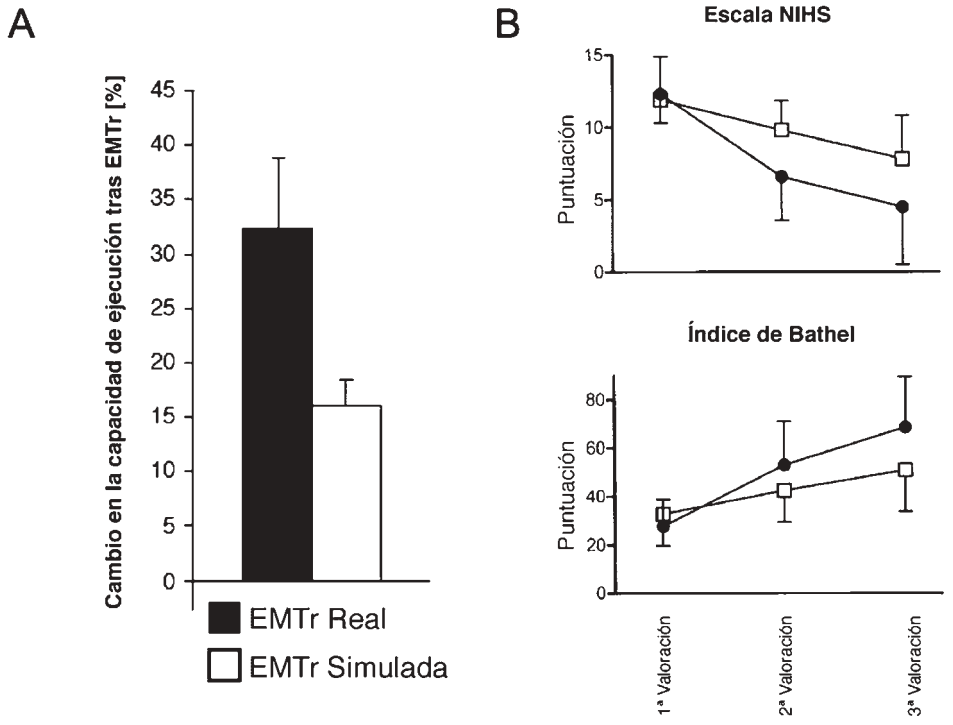


FIGURA 5. ***A.*** *Modificado de (Mansur et al., 2005). El histograma muestra la importante mejoría en el desempeño de la tarea del tablero de Purdue en pacientes con ictus (con un promedio de evolución de 12 meses) tras EMTr lenta real (no simulada) en el hemisferio no afectado, para disminuir la inhibición interhemisférica del hemisferio lesionado y mejorar la función motora.*
B. *Modificado de (Khedr et al., 2005). Las evaluaciones seriadas en pacientes con Ictus sometidos a 10 días de EMTr real o simulada, a alta frecuencia, sobre la corteza motora afectada. Las escalas de discapacidad (índice de Barthel y la NIH Stroke Scale), medidas antes de la EMT, al final de la última sesión y 10 días más tarde, muestran que la EMT real (símbolos sólidos) mejoró significativamente las puntuaciones de los pacientes, respecto a la EMT simulada (símbolos huecos).*

Por supuesto, la estrategia alternativa de neuromodulación, directamente encaminada a aumentar la excitabilidad del hemisferio dañado alrededor de la lesión, también puede ser contemplada. Khedr *et al*. (73) han reportado resultados muy alentadores en este sentido. Es posible aplicar estos mismos principios de neuromodulación para la recuperación de ictus sobre áreas no motoras y otras lesiones cerebrales focales, como se ilustra en los estudios sobre los efectos de la estimulación cortical en negligencia, discutidos con anterioridad (13-15) o en pacientes con afasia (74, 75).

No existen datos concluyentes sobre los patrones específicos de activación neuronal que predicen la recuperación de la afasia, pero estudios recientes revelan que los pacientes con mejor recuperación, a menudo presentan mayor activación en el hemisferio izquierdo (76, 77) y, en particular, en la circunvolución temporal superior izquierda (78). Algunos estudios informan que la activación de nuevas regiones en el hemisferio izquierdo se asocia con una mejoría después de un programa de logopedia (79-81). Por otra parte, los estudios de neuroimagen funcional de pacientes con afasia no fluente residual han observado niveles de activación inusualmente alta en las estructuras homólogas a la región perisilviana del lenguaje pero en el hemisferio derecho (82, 83), que no se correlacionaron con una mejoría en el lenguaje (83-85). De hecho, el aumento de activación en el hemisferio derecho podría estar obstaculizando la recuperación. Siguiendo esta hipótesis de la plasticidad maladaptativa en el hemisferio derecho llevamos a cabo estudios para disminuir la actividad en el hemisferio derecho en áreas homólogas a las específicas del lenguaje, con el fin de fomentar la rehabilitación funcional en la afasia no fluente.

El primer estudio tuvo como objetivo investigar el efecto de la supresión temporal de la actividad, mediante EMTr a 1 Hz, en cuatro localizaciones corticales en el hemisferio derecho, sobre una tarea de nombrar dibujos. Estudiamos seis pacientes con afasia crónica no fluente por una lesión en el hemisferio izquierdo (4 hombres, 2 mujeres; con una edad de 51 a 67 Años, de 5 a 30 años de evolución tras el Ictus). Presentaban una afasia no fluente de leve a severa con una longitud máxima de expresión de 1 a 4 palabras. Todos presentaban lesiones corticales en el hemisferio izquierdo que incluía una parte del área de Broca (pars triangularis y la pars opercularis), y / o de la sustancia blanca a nivel más profundo (Figura 6).

Aplicamos EMTr a 1 Hz, en diferentes sesiones, para suprimir transitoriamente la actividad en la pars triangularis del hemisferio derecho; la pars opercularis del hemisferio derecho; la corteza motora derecha sobre la representación de la boca (M1, orbicular de los labios); y la circunvolución temporal superior derecha (AB

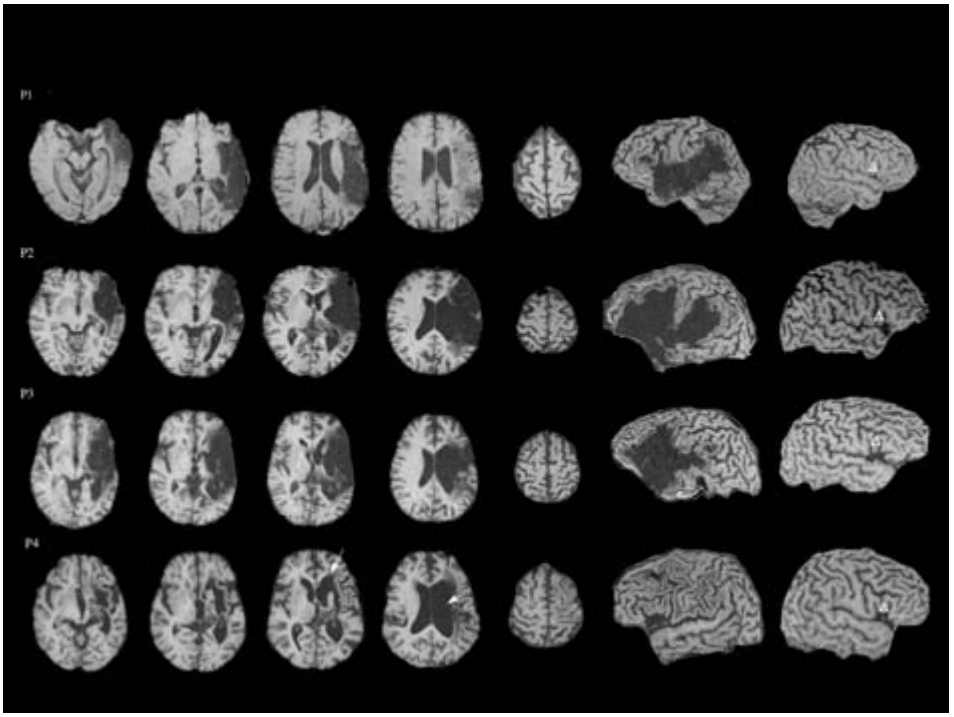


FIGURA 6. *Modificado de (Naesser et al., 2004). Reconstrucción de la representación de las lesiones en un grupo de pacientes con afasia crónica no fluida.*

22 D) o la circunvolución anterior supramarginal (BA 40). La EMT se aplicó durante 10 minutos (600 pulsos) al 90 del umbral de motor con una bobina en forma de 8 y 7 cm. de diámetro, (MagStim, NY). Utilizamos un sistema estereotáxico sin marco (Brainsight, Rogue Industries, Montreal) para guiar la posición de la bobina sobre la cabeza del paciente y documentar la localización específica de la EMT, de forma precisa, sobre cada de las regiones específicas del cerebro.

Antes de la primera sesión de EMTr, se determinó la capacidad basal de nominación del paciente, solicitando que nombraran las imágenes de una lista estandarizada (Figuras de Snodgrass y Vanderwart). Se utilizaron cinco conjuntos de imágenes (con 20 figuras en cada uno). Cada conjunto tenía el mismo nivel de dificultad o complejidad. Inmediatamente después de cada sesión de 10 minutos de EMTr, se evaluó de nuevo la capacidad del paciente para nombrar una lista distinta de imágenes. El orden interno de las listas y de las presentaciones fueron determinados al azar.

Los seis pacientes nombraron correctamente un número mayor de imágenes después de la aplicación de EMTr sobre la pars triangularis derecha, AB 45 D (Figura 7). Se observó un efecto significativo para la zona de aplicación de EMTr relativo al número de figuras nombradas correctamente y el tiempo de reacción. Los pacientes nombraron muchos más elementos después de la EMTr en el AB 45 derecha que en AB 44 derecha; la M1 derecha; y el AB 22 derecha. El valor promedio de los elementos nombrados indicaba que, después de la EMTr en el AB 45 derecha, nombraron correctamente 3 elementos más que al inicio del estudio o después de cualquier estimulación en cualquier otra de las áreas. Tras la EMTr sobre el AB 44 derecha los sujetos tendían a nombrar menos elementos y a hacerlo más despacio (Figura 7).

Tras la confirmación de este patrón de efecto para la EMTr de áreas homólogas del lenguaje en el hemisferio derecho, se llevó a cabo un estudio en un único paciente, para analizar el efecto de la colocación de la bobina de EMT, ubicándola en distintas localizaciones de la cabeza, separadas entre sí por tan sólo 1 cm. Se valoró la capacidad de nominación de imágenes, antes y 10 minutos después de la aplicación de EMTr a 1-Hz sobre cada área. El mayor número de imágenes nombradas correctamente, de forma sistemática, se produjo tras la EMTr del AB 45 del hemisferio derecho (veáse la Figura 8).

Una vez que se determinó el AB 45 del hemisferio derecho como la más eficaz para inducir un resultado beneficioso en la fluencia verbal de pacientes afásicos, se puso en marcha un estudio para determinar si trenes más largos de EMTr, localizados específicamente sobre el AB 45 derecha, podrían producir efectos beneficiosos a largo plazo para los pacientes (75). Presentamos el resultado en cuatro pacientes diestros con afasia no fluente residual moderadamente grave con una evolución de 5 a 11 años tras la instauración de un ictus izquierdo en el territorio de la arteria cerebral media. Los pacientes recibieron diez sesiones, 5 días a la semana durante 2 semanas, de 20-minutos de EMTr a 1 Hz, (1.200 pulsos por sesión) al 90% del umbral de motor, utilizando la misma bobina de EMT y el mismo programa de guía estereotáxica, Brainsight ®, descrito anteriormente.

Las medidas principales de resultado eran test estandarizados para la evaluación del lenguaje, incluyendo los primeros 20 ítems del Test de Denominación de Boston (BNT) y partes de la Batería de Boston para el Diagnóstico del la Afasia (BDAE). Los pacientes fueron evaluados mediante estas pruebas por un logopeda que desconocía las condiciones de estimulación, entre 1 y 2 semanas antes de la 1 ª sesión de EMTr y de nuevo a las 2 semanas, 2 meses y 8

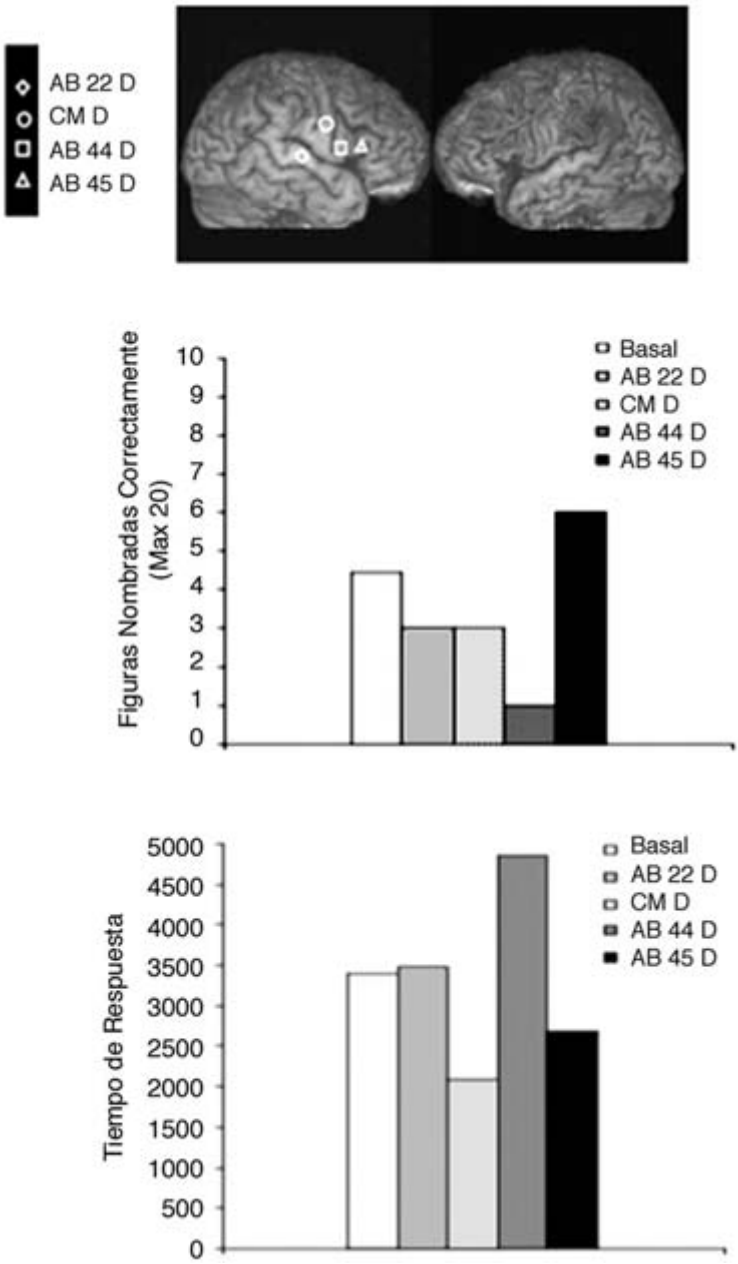


FIGURA 7. *Modificado de (Naesser et al., 2005). Efecto de la EMTr a 1 Hz sobre distintas localizaciones. Nótese el efecto significativo del a EMT sobre el AB 45 D, en relación con el resto de localizaciones, particularmente respecto a la estimulación en el AB 44 D.*

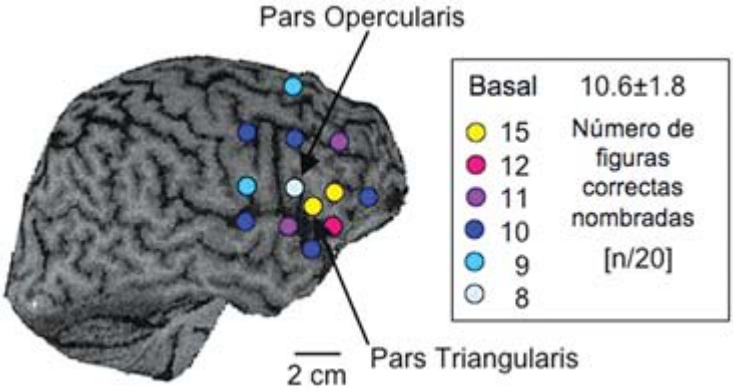


FIGURA 8. *Modificado de (Naesser et al., 2005). Ilustración de la focalidad del efecto de la estimulación, en un único sujeto, en estudios seriados, con distintas localizaciones de la bobina de estimulación, separadas entre si 1 cm.*

meses después de la 10ª sesión de estimulación. Los pacientes no recibieron ningún tipo de sesiones de logopedia individualizada durante el estudio.

A los 2 meses de EMTr, hubo una mejoría significativa en el BNT, y en los subapartados de nominación de Animales y Herramientas en la BDAE (Figura 9). A los 8 meses, las tres puntuaciones en la nominación siguieron mejorando en relación a las pruebas previas a la EMTr. Se observó una mejoría en el número de palabras para la frase más larga. Por ejemplo, uno de los pacientes aumentó de frases de 1 palabra a frases de 3 palabras, al describir la Escena del robo de galletas a los 2 meses tras la EMT. Este aumento se mantuvo en la valoración a los 8 meses tras la EMT.

Este es el primer estudio que ha reportado una mejoría duradera en la nominación a los 2 meses y 8 meses después de la aplicación de EMTr en pacientes con afasia crónica. Los resultados sugieren que un plazo de 2 meses tras la administración de la EMTr podría ser el momento óptimo para proporcionar logopedia reglada, con el fin de promover un mayor grado de recuperación de la función del lenguaje. Sin duda estos resultados deben considerarse preliminares dado el diseño abierto. Sin embargo, los 4 pacientes se encontraban en fase crónica, estabilizados respecto a la evolución de su afasia, habiendo transcurrido varios años desde el periodo de recuperación espontánea, de 3 a 6 meses después del ictus (86). En estos momentos está en marcha un estudio de grupos paralelos, aleatorio, doble ciego, controlado frente a placebo con

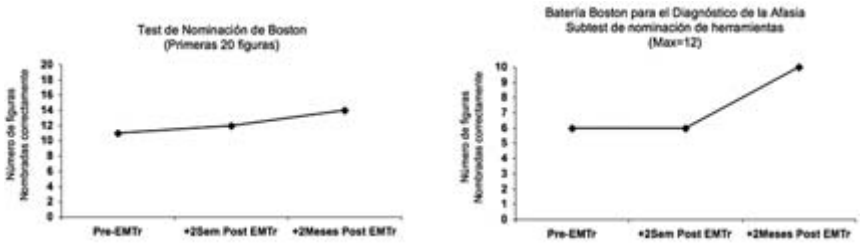


FIGURA 9: *Modificado de (Naesser et al., 2005). Efecto de trenes repetidos de EMTr en 10 días sucesivos (2 semanas, de lunes a viernes), sobre la capacidad de nominación de sujetos con afasia crónica no fluida, y patrón temporal del efecto alzcanzado.*

estimulación simulada, cuyos resultados preliminares refuerzan estas mismas conclusiones. La continuidad del beneficio comportamental varios meses después de la EMTr sugiere que la interrupción de un nodo específico de una red neuronal concreta, la pars triangularis derecha, podría haber inducido a un cambio en la actividad relativa entre los distintos nodos de la red neuronal implicada y, posiblemente, haber promovido un cambio en el representación cerebral de un determinado comportamiento. Este cambio puede ser conceptualizado como un cambio de estrategia que, en este caso concreto, dió lugar a una estrategia más adaptable que generó un beneficio continuo y la mejoría funcional.

Sin embargo, continúan existiendo interrogantes en la aplicación de estas estrategias, de modo que nuestra comprensión de los distintos factores implicados y sobre cómo optimizar e individualizar las intervenciones de neuromodulación es todavía bastante incompleta. En cualquier caso, las estrategias de neuromodulación basadas en técnicas de estimulación cerebral no son las únicas alternativas para orientar la plasticidad con finalidad terapéutica. Las intervenciones conductuales, que incluyen la aplicación de tecnologías, como la robótica o las tareas de rehabilitación informatizadas, así como los métodos farmacológicos pueden ser igualmente eficaces.

Otra cuestión interesante a considerar es la posibilidad de modular la plasticidad de manera similar a la descrita, con la finalidad de fomentar una ganancia comportamental en sujetos sanos (87-90). ¿Sería posible, por ejemplo, promover la adquisición de habilidades, o el aprendizaje verbal o no verbal, promoviendo algunos cambios plásticos y suprimiendo otros? Este tipo de planteamientos despierta dilemas éticos importantes, pero también ofrece la posibilidad de intervenciones que podrían ser aplicables en contextos educativos y, de

forma translacional, a pacientes. Por ejemplo, en consonancia con los resultados en la recuperación de la función motora de la mano después de un ictus, la estimulación cortical no invasiva que suprime la excitabilidad en la M1 ipsilateral, o aumenta la excitabilidad en la M1 contralateral a la mano lesionada, podría dar lugar a diferentes grados de mejoría en la función motora en seres humanos sanos. La estimulación transcraneal por corriente continua (TDCs), anodal, aplicada sobre la M1 para aumentar su excitabilidad antes o durante la práctica de una determinada tarea puede inducir mejoras en el aprendizaje motor implícito medido con tareas de tiempo de reacción seriado (91), el desempeño de una tarea de coordinación visuomotora (92) y una tareas de movimientos secuenciales de los dedos (93), y los resultados de la prueba de función de la mano Jebsen Taylor (JTT) (94). Del mismo modo, la aplicación de EMTr a 1Hz para suprimir la excitabilidad de la M1 ipsilateral a la mano ejercitada resultó en una mejora para el aprendizaje de secuencias motoras (95). Sin embargo, estos efectos podrían ser específicos para la tarea y la condición de estimulación. Por ejemplo, el aprendizaje de una tarea más compleja de seguimiento de dedos no fue modificado por la misma EMTr a 1Hz para suprimir la excitabilidad de la M1 ipsilateral a la mano entrenada (96), y los efectos beneficiosos de la estimulación anodal con TDCs la mano contralateral en la JTT se limitan a la mano no dominante en adultos jóvenes sanos y en ancianos (94).

CONCLUSIONES

El cerebro es intrínsicamente plástico y esa plasticidad representa el invento de la evolución para que el sistema nervioso pueda escapar a las restricciones de su propio genoma (y a la especificidad de sus células, altamente especializadas) y adaptarse a los cambios rápidos y a menudo impredecibles ambientales y comportamentales. Los cambios plásticos pueden no representar una ganancia del comportamiento para una determinada persona. En cambio, la plasticidad puede ser tanto la causa de una patología o de una enfermedad, como el sustrato para la adquisición de habilidades, el aprendizaje, la adaptación al medio y la recuperación tras una lesión. La recuperación de una función después de una lesión cerebral focal, por ejemplo, un ictus es, esencialmente, aprender con una red neuronal parcialmente alterada e ilustra los peligros y las oportunidades de un cerebro plástico. La plasticidad se podría concebir como un proceso de dos etapas, con una modulación inicial rápida de la conectividad a través de redes neuronales, seguida, posiblemente, de cambios estructurales más estables. Estas dos etapas se pueden modelar desde su regulación por distintos

mecanismos de represión y potenciación de la plasticidad, que pueden ser responsables de diversas patologías, pero también ofrecen oportunidades para diseñar intervenciones neurofarmacológicas y neuromoduladores, destinadas a promover cambios en la organización cerebral de la conducta, pudiendo resultar más adecuadas para cada persona.

BIBLIOGRAFÍA

(1) A. Pascual-Leone, R. Hamilton, *Prog Brain Res* 134, 427 (2001).

(2) A. Pascual-Leone, A. Amedi, F. Fregni, L.B. Merabet, *Annu Rev Neurosci* 28, 377 (2005).

(3) A. Valero-Cabre, B.R. Payne, J. Rushmore, S.G. Lomber, A. Pascual-Leone, *Exp. Brain Res.* 163, 1 (May, 2005).

(4) A. Valero-Cabre, B.R. Payne, A. Pascual-Leone, *Exp. Brain Res.* 176, 603 (Feb, 2007).

(5) L. Lee *et al.*, *J. Neurosci* 23, 5308 (Jun 15, 2003).

(6) W.H. Chen *et al.*, *Clin. Neurophysiol* 114, 1628 (Sep, 2003).

(7) A. Oliviero, L.H. Strens, V. Di Lazzaro, P.A. Tonali, P. Brown, *Exp. Brain Res.* 149, 107 (Mar, 2003).

(8) L.H. Strens, N. Fogelson, P. Shanahan, J.C. Rothwell, P. Brown, *Curr. Biol.* 13, 1201 (Jul 15, 2003).

(9) P. Vuilleumier, D. Hester, G. Assal, F. Regli, *Neurology* 46, 184 (Jan, 1996).

(10) N. Kapur, *Brain* 119 (Pt 5), 1775 (Oct, 1996).

(11) J.M. Sprague, *Science* 153, 1544 (Sep 23, 1966).

(12) B.R. Payne, S.G. Lomber, S. Geeraerts, E. van der Gucht, E. Vandenbussche, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93, 290 (Jan 9, 1996).

(13) C.C. Hilgetag, H. Theoret, A. Pascual-Leone, *Nat. Neurosci* 4, 953 (Sep, 2001).

(14) F. Brighina *et al.*, *Neurosci Lett* 336, 131 (Jan 16, 2003).

(15) M. Oliveri *et al.*, *Brain* 122 (Pt 9), 1731 (Sep, 1999).

(16) D. Bavelier, H.J. Neville, *Nat. Rev Neurosci* 3, 443 (Jun, 2002).

(17) H. Neville, D. Bavelier, *Prog. Brain Res.* 138, 177 (2002).

(18) A. Pascual-Leone *et al.*, *J. Neurophysiol* 74, 1037 (Sep, 1995).

(19) J.A. Kleim *et al.*, *Nat Neurosci* 9, 735 (Jun, 2006).

(20) A. Pascual-Leone, *Ann N.Y Acad. Sci.* 930, 315 (Jun, 2001).

(21) S.T. Grafton *et al.*, *J. Neurosci* 12, 2542 (Jul, 1992).

(22) I.H. Jenkins, D.J. Brooks, P.D. Nixon, R.S. Frackowiak, R.E. Passingham, *J. Neurosci* 14, 3775 (Jun, 1994).

(23) A. Karni *et al.*, *Nature* 377, 155 (Sep 14, 1995).

(24) A. Karni *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95, 861 (Feb 3, 1998).

(25) R.J. Seitz, E. Roland, C. Bohm, T. Greitz, S. Stone-Elander, *Neuroreport* 1, 57 (Sep, 1990).

(26) J.A. Kleim *et al.*, *J. Neurosci* 24, 628 (Jan 21, 2004).

(27) B. Lu, *Learn Mem* 10, 86 (Mar-Apr, 2003).

(28) L.M. Boulanger, G.S. Huh, C.J. Shatz, *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 568 (Oct, 2001).

(29) G.S. Huh *et al.*, *Science* 290, 2155 (Dec 15, 2000).

(30) G. Lynch, C.S. Rex, C.M. Gall, *Neuropharmacology* 52, 12 (Jan, 2007).

(31) Y. Akaneya, T. Tsumoto, S. Kinoshita, H. Hatanaka, *J. Neurosci* 17, 6707 (Sep 1, 1997).

(32) M. Korte *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92, 8856 (Sep 12, 1995).

(33) A. Figurov, L.D. Pozzo-Miller, P. Olafsson, T. Wang, B. Lu, *Nature* 381, 706 (Jun 20, 1996).

(34) A.Y. Klintsova, E. Dickson, R. Yoshida, W. T. Greenough, *Brain Res* 1028, 92 (Nov 26, 2004).

(35) A. Arai, M. Kessler, G. Lynch, *Neurosci Lett* 119, 41 (Oct 30, 1990).

(36) U. Staubli, P. Vanderklish, G. Lynch, *Behav Neural Biol.* 53, 1 (Jan, 1990).

(37) R.A. Corriveau, G.S. Huh, C.J. Shatz, *Neuron* 21, 505 (Sep, 1998).

(38) J. Syken, T. Grandpre, P.O. Kanold, C.J. Shatz, *Science* 313, 1795 (Sep 22, 2006).

(39) T. Hutchin *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21, 4174 (Sep 11, 1993).

(40) K. Inoue *et al.*, *Biochem Biophys Res. Commun* 223, 496 (Jun 25, 1996).

(41) T.R. Prezant *et al.*, *Nat. Genet* 4, 289 (Jul, 1993).

(42) A. Quartarone, H.R. Siebner, J.C. Rothwell, *Trends Neurosci* 29, 192 (Apr, 2006).

(43) K. Rosenkranz, A. Williamon, J.C. Rothwell, *J. Neurosci* 27, 5200 (May 9, 2007).

(44) P. Chamagne, *Hand Clin* 19, 309 (May, 2003).

(45) K. Rosenkranz *et al.*, *Neurology* 70, 304 (Jan 22, 2008).

(46) H. Flor, *Expert Rev Neurother* 8, 809 (May, 2008).

(47) F. Fregni, A. Pascual-Leone, S.D. Freedman, *Pancreatology* 7, 411 (2007).

(48) M. Zhuo, *Trends Neurosci* 31, 199 (Apr, 2008).

(49) H. Bartels, M.J. Staal, F.W. Albers, *Otol. Neurotol.* 28, 178 (Feb, 2007).

(50) D.O. Frost *et al.*, *Biol. Psychiatry* 56, 540 (Oct 15, 2004).

(51) S. Hayley, M.O. Poulter, Z. Merali, H. Anisman, *Neuroscience* 135, 659 (2005).

(52) J.L. Rapoport, N. Gogtay, *Neuropsychopharmacology* 33, 181 (Jan, 2008).

(53) P.W. Kalivas, C. O'Brien, *Neuropsychopharmacology* 33, 166 (Jan, 2008).

(54) J.A. Kauer, R.C. Malenka, *Nat. Rev. Neurosci* 8, 844 (Nov, 2007).

(55) D.J. Selkoe, *Behav Brain Res* 192, 106 (Sep 1, 2008).

(56) E.M. Morrow *et al.*, *Science* 321, 218 (Jul 11, 2008).

(57) M.F. Bear, G. Dolen, E. Osterweil, N. Nagarajan, *Neuropsychopharmacology* 33, 84 (Jan, 2008).

(58) W.T. O'Donnell, S.T. Warren, *Annu Rev Neurosci* 25, 315 (2002).

(59) O. Penagarikano, J.G. Mulle, S.T. Warren, *Annu Rev. Genomics Hum Genet* 8, 109 (2007).

(60) J.C. Lauterborn *et al.*, *J. Neurosci* 27, 10685 (Oct 3, 2007).

(61) M. Alonso-Alonso, F. Fregni, A. Pascual-Leone, *Cerebrovasc Dis* 24 Suppl 1, 157 (2007).

(62) S.C. Cramer, J.D. Riley, *Curr. Opin. Neurol.* 21, 76 (Feb, 2008).

(63) M. Di Filippo *et al.*, *Neuropharmacology* 55, 353 (Sep, 2008).

(64) R.J. Nudo, *Curr. Opin. Neurobiol* 16, 638 (Dec, 2006).

(65) J. Liepert, P. Storch, A. Fritsch, C. Weiller, *Clin Neurophysiol* 111, 671 (Apr, 2000).

(66) N. Murase, J. Duque, R. Mazzocchio, L.G. Cohen, *Ann. Neurol.* 55, 400 (Mar, 2004).

(67) T. Shimizu *et al.*, *Brain* 125, 1896 (Aug, 2002).

(68) F. Fregni, A. Pascual-Leone, *Cogn. Behav Neurol.* 19, 21 (Mar, 2006).

(69) P.M. Rossini *et al.*, *Eura Medicophys* 43, 241 (Jun, 2007).

(70) N.S. Ward, L.G. Cohen, *Arch. Neurol.* 61, 1844 (Dec, 2004).

(71) C.G. Mansur *et al.*, *Neurology* 64, 1802 (May 24, 2005).

(72) K.J. Werhahn, A.B. Conforto, N. Kadom, M. Hallett, L.G. Cohen, *Ann. Neurol.* 54, 464 (Oct, 2003).

(73) E.M. Khedr, M.A. Ahmed, N. Fathy, J.C. Rothwell, *Neurology* 65, 466 (Aug 9, 2005).

(74) P.I. Martin *et al*., *Semin Speech Lang* 25, 181 (May, 2004).

(75) M.A. Naeser *et al*., *Brain Lang* 93, 95 (Apr, 2005).

(76) K. Miura *et al*., *J Neurol* 246, 939 (Oct, 1999).

(77) E. Warburton, C.J. Price, K. Swinburn, R.J. Wise, *J. Neurol Neurosurg Psychiatry* 66, 155 (Feb, 1999).

(78) W.D. Heiss, J. Kessler, A. Thiel, M. Ghaemi, H. Karbe, *Ann Neurol* 45, 430 (Apr, 1999).

(79) K. Cornelissen *et al*., *J. Cogn. Neurosci* 15, 444 (Apr 1, 2003).

(80) A. Leger *et al*., *Neuroimage* 17, 174 (Sep, 2002).

(81) S.L. Small, D.K. Flores, D.C. Noll, *Brain Lang* 62, 298 (Apr, 1998).

(82) P. Belin *et al*., *Neurology* 47, 1504 (Dec, 1996).

(83) H.J. Rosen *et al*., *Neurology* 55, 1883 (Dec 26, 2000).

(84) M.A. Naeser *et al*., *Neuroimage* 22, 29 (May, 2004).

(85) D. Perani *et al*., *Brain Lang* 85, 357 (Jun, 2003).

(86) G. Demeurisse *et al*., *Stroke* 11, 455 (Sep-Oct, 1980).

(87) T. Canli *et al*., *Am J. Bioeth* 7, 3 (May, 2007).

(88) R. de Jongh, I. Bolt, M. Schermer, B. Olivier, *Neurosci Biobehav Rev.* 32, 760 (2008).

(89) M.J. Farah *et al*., *Nat. Rev. Neurosci* 5, 421 (May, 2004).

(90) C. Lanni *et al*., *Pharmacol Res*. 57, 196 (Mar, 2008).

(91) M.A. Nitsche *et al*., *J. Cogn Neurosci* 15, 619 (May 15, 2003).

(92) A. Antal *et al*., *Eur J. Neurosci* 19, 2888 (May, 2004).

(93) B.W. Vines, D.G. Nair, G. Schlaug, *Neuroreport* 17, 671 (Apr 24, 2006).

(94) P.S. Boggio *et al*., *Neurosci Lett* 404, 232 (Aug 14, 2006).

(95) M. Kobayashi, S. Hutchinson, H. Theoret, G. Schlaug, A. Pascual-Leone, *Neurology* 62, 91 (Jan 13, 2004).

(96) J.R. Carey, F. Fregni, A. Pascual-Leone, *Restor Neurol Neurosci* 24, 191 (2006).

Socios de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia a quien expresamos nuestra sincera gratitud por su mecenazgo:

CAJA MADRID

Farmaindustria

Roche Farma

Laboratorios Janssen-Cilag
Alcaliber S.A.
Almirall, S.A.
Bristol-Myers Squibb, S.L.
Grupo Ferrer Internacional
Laboratorios Esteve
Laboratorios MSD
Laboratorios Rovi
Novartis Farmacéutica
Tedec-Meiji Farma S.A.
Sanofi-Aventis
Laboratorios Menarini

Aragofar

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos
Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid

Colegios Oficiales de Farmacéuticos de: A Coruña, Alicante, Badajoz, Barcelona, Bizkaia, Burgos, Cáceres, Cádiz, Ciudad Real, Girona, Palencia, Principado de Asturias, Santa Cruz de Tenerife, Tarragona, Toledo y Zaragoza.