INSTITUTO DE ESPAÑA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

MONOGRAFÍA XXV

AVANCES EN NEUROCIENCIA: NEUROTRANSMISORES Y PATOLOGÍAS NERVIOSAS

Editores:

María Teresa Miras Portugal y Antonio Rodríguez Artalejo



Madrid, 2009



Índice

	_	Págs.
Rela	ación de participantes	5
Pr	ólogo. María Teresa Miras Portugal y Antonio Rodríguez Artalejo	15
1.	Mecanismos implicados en la axonogénesis, el cr axonal y la localización de pr oteínas en el axón. Juan José Garrido y Miguel Díaz Hernández	19
2.	Los canales de comunicación sensorial TRPs como dianas far- macológicas. Antonio Ferrer Montiel	49
3.	La maquinaria molecular de la exocitosis: ¿un nuevo mar cador en las enfermedades neur odegenerativas? Diego Bustillo Merino, Yolanda Gutiérrez Martín y Antonio Rodríguez Artalejo	71
4.	Neurotransmisión mediada por nucleótidos: perspectivas terapéuticas en nuer odegeneración y neur oprotección. María Teresa Miras Portugal y Javier Gualix	101
5.	Fisiopatología de la neurotransmisión glicinérgica inhibidora. Carmen Aragón Rueda y Beatriz López-Corcuera	147
6.	Endocannabinoides: un nuevo sistema de comunicación en el cerebro. Manuel Guzmán e Ismael Galve-Roperh	177
7.	Regulación transcripcional dependiente de calcio en el sistema nervioso. José Ramón Naranjo y Rosa Gómez-V illafuertes	195
8.	Modelos animales de enfermedades neur odegenerativas: ejemplo de la enfermedad de Huntington. José J. Lucas y Zaira Ortega	237
9.	Muerte neuronal mediada por la proteína tau a través de receptores muscarínicos. Implicación de tau en la propagación de la enfermedad de Alzheimer. Alberto Gómez-Ramos y Jesús Ávila	273

ÍNDICE

10.	Hipótesis glutamatérgica de la esquizofr enia. Cecilio Giménez y Francisco Zafra	287
11.	Enfermedad de Lafora: epilepsia y r egulación del metabolismo de glucógeno por laforina y malina. David Vílchez, Santiago Rodríguez de Córdoba y Joan J. Guinovart	315
12.	El ojo, ventana al Sistema Nervioso Central. Concepción Santano Sánchez y Jesús Pintor Just	347

Relación de participantes



CARMEN ARAGÓN RUEDA

Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular . Dpto. de Biología Molecular . Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Universidad Autónoma de Madrid. C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049, Madrid. Tfno.: +34 91 196 4632. Fax: +34 91 196 4420

JESÚS ÁVILA DE GRADO

Profesor de Investigación CSIC

caragon@cbm.uam.es

Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» (CSIC-UAM).

Universidad Autónoma de Madrid.

C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049, Madrid.

Tfno.: +34 91 1964564. Fax: +34 91 1964420.

javila@cbm.uam.es





DIEGO BUSTILLO MERINO

Becario Predoctoral del Gobierno Vasco. Dpto. de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Av. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid. Tfno.: +34 91 394 38 56. bustillomerino@vet.ucm.es

MIGUEL DÍAZ HERNÁNDEZ

Contratado Ramón y Cajal.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV.

Facultad de Veterinaria.

Universidad Complutense de Madrid.

Av. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid.

Tfno.: +34 91 394 38 90. Fax: +34 91 394 39 09

migueldiaz@vet.ucm.es





ANTONIO FERRER MONTIEL

Catedrático de Universidad. Subdirector Instituto Biología Molecular y Celular . Universidad Miguel Hernández. Av. de la Universidad s/n. 03202, Elche. Tfno.: +34 96 665 87 27. Fax: +34 96 885 87 58. aferrer@umh.es



ISMAEL GALVE-ROPERH

Profesor Titular.

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, y Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universidad Complutense, 28040 Madrid

Teléfono: +34 91 394 46 68. Fax: +34 91 394 46 72

Correo electrónico: igr@quim.ucm.es

JUAN JOSÉ GARRIDO JURADO

Científico Titular del CSIC.

Dpto. de Neurobiología Celular Molecular y del
Desarrollo. Instituto Cajal, CSIC.
Av. Doctor Arce, 37. 28002, Madrid.
Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa».

CSIC-UAM. C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049, Madrid.
Tfno.: +34 91 196 45 61. Fax: +34 91 196 44 20.

ijgarrido@cbm.uam.es





CECILIO GIMÉNEZ MARTÍN

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular . Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Universidad Autónoma de Madrid. C.S.I.C. C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049, Madrid. Tfno.: +34 91 196 46 29. Fax: +34 91 196 44 20.

cgimenez@cbm.uam.es



ALBERTO GÓMEZ RAMOS

Investigador Postdoctoral.
Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» (CSIC-UAM).
Universidad Autónoma de Madrid.
C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049, Madrid.
Tfno.: +34 91 196 45 92. Fax: +34 91 196 44 20. agomez@cbm.uam.es

ROSA GÓMEZ-VILLAFUERTES

Becaria Postdoctoral.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV.
Facultad de Veterinaria.

Universidad Complutense de Madrid.
Av. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid.

Tfno.: +34 91 394 38 90. Fax: +34 91 394 39 09.

marosa@vet.ucm.es





JAVIER GUALIX

Profesor Titular. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Av. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid. Tfno.: +34 91 394 38 90. Fax: +34 91 394 39 09. jgualix@vet.ucm.es



JOAN J. GUINOVART

Director del Instituto de Investigación Biomédica (IRB Barcelona) y Catedrático del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular . Universidad de Barcelona. Institute for Research in Biomedicine, Parc Científic de Barcelona. C/ Baldiri Reixac, 10-12. 08028, Barcelona. Tfno.: +34 93 403 71 63. Fax: +34 93 403 71 14. guinovart@irbbarcelona.org

YOLANDA GUTIÉRREZ MARTÍN

Investigadora Postdoctoral Contratada.
Dpto. de Toxicología y Farmacología.
Facultad de Veterinaria.
Universidad Complutense de Madrid.
Av. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid.
Tfno.: +34 91 394 38 56.
ygmartin@vet.ucm.es





MANUEL GUZMÁN

Catedrático del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I. Facultad de Biología y Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Universidad Complutense. 28040, Madrid. Tfno.: +34 91 394 46 68. Fax: +34 91 394 46 72.

mgp@bbm1.ucm.es



BEATRIZ LÓPEZ CORCUERA

Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular. Dpto. de Biología Molecular . Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Universidad Autónoma de Madrid. C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049, Madrid. Tfno.: +34 91 196 46 31. Fax: +34 91 196 44 20. blopez@cbm.uam.es

JOSÉ JAVIER LUCAS LOZANO

Profesor de Investigación del CSIC.
Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa».
CSIC/UAM (Lab 209).
Universidad Autónoma de Madrid.
C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049, Madrid.
Tfno.: +34 91 196 45 52 / +34 91 196 45 82 (Lab).
Fax: +34 91 196 44 20.
jjlucas@cbm.uam.es.
http://www.cbm.uam.es/lineas/joselucas.htm

http://www.ciberned.es/grupojoselucas.aspx





MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL

Catedrática del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Av. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid. Tfno.: +34 91 394 38 94. Fax: +34 91 394 39 09. mtmiras@vet.ucm.es



JOSÉ RAMÓN NARANJO

Profesor de Investigación del CSIC.

Dpto. de Biología Molecular y Celular .

Centro Nacional de Biotecnología.

Universidad Autónoma de Madrid.

C/ Darwin, 3. 28049, Madrid.

Tfno.: +34 91 585 46 82. Fax: +34 91 585 45 06.

naranjo@cnb.csic.es

ZAIRA ORTEGA LLORENTE

Investigadora Predoctoral. Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa». Universidad Autónoma de Madrid. C/ Nicolás Cabrera, 1. Lab 209. 28049, Madrid. Tfno.: +34 91 196 45 82. Fax: +34 91 196 44 20. zortega@cbm.uam.es





JESÚS PINTOR JUST

Profesor Titular de Universidad.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV.

Escuela Universitaria de Óptica.

Universidad Complutense de Madrid.

C/ Arcos de Jalón, s/n. 28037, Madrid.

Tfno.: +34 91 394 68 59. Fax: +34 91 394 68 85.

jpintor@vet.ucm.es



ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO

Catedrático de Farmacología.

Dpto. de Toxicología y Farmacología.

Facultad de Veterinaria.

Universidad Complutense de Madrid.

Av. Puerta de Hierro, s/n. 28040, Madrid.

Tfno.: +34 91 394 38 51.

antonio.artalejo@vet.ucm.es

SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA

Profesor de Investigación del CSIC.

Dpto. de Fisiopatología Celular y Molecular .

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

C/ Ramiro de Maeztu, 9. 28040, Madrid.

Tfno.: +34 91 837 31 12 x4432.

Fax: +34 91 536 04 32.

SRdeCordoba@cib.csic.es





CONCEPCIÓN SANTANO SÁNCHEZ

Investigadora Postdoctoral.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV.
Escuela Universitaria de Óptica.
Universidad Complutense de Madrid.
C/ Arcos de Jalón, s/n. 28037, Madrid.
Tfno.: +34 91 394 68 59. Fax: +34 91 394 68 85.
concepcionsantano@opt.ucm.es



DAVID VÍLCHEZ

Investigador Postdoctoral.

Laboratorio de Ingeniería Metabólica y Terapia de la Diabetes. Programa de Medicina Molecular .

Instituto de Investigación Biomédica (IRB Barcelona). Institute for Research in Biomedicine,
Parc Científic de Barcelona.

C/ Baldiri Reixac, 10-12. 08028, Barcelona.

Tfno.: +34 93 403 71 63. Fax: +34 93 403 71 14. david.vilchez@irbbarcelona.org

FRANCISCO ZAFRA GÓMEZ

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular .
Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa».
Universidad Autónoma de Madrid. C.S.I.C.
C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049, Madrid.
Tfno.: +34 91 196 46 30. Fax: +34 91 196 44 20.
fzafra@cbm.uam.es



M.ª TERESA MIRAS PORTUGAL y ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO

La neurociencia es sin duda la última frontera en el conocimiento de los seres vivos y una de las disciplinas de más rápido crecimiento. La cooperación científica ha conseguido mediante una aproximación multidisciplinar abordar el estudio de la estructura y función del cerebro normal y patológico. El campo de las neurociencias cubre desde la biología molecular de las células nerviosas, qué genes son necesarios y cómo se expresan y regulan, así como los productos proteicos que originan y su lugar y función en la célula, hasta las bases biológicas del comportamiento, el mundo de las emociones, o la creatividad.

La herencia de Don Santiago Ramón y Cajal ha estimulado el estudio y la investigación en neurociencias en nuestro país y esta monografía pretende solamente destacar algunos aspectos en los que nuestros investigadores han sido y son pioneros. El número de capítulos es necesariamente reducido pero servirá sin duda, siguiendo la cadena del conocimiento, para estimular a nuestros jóvenes y dar satisfacción a todos aquellos que siendo de otras disciplinas científicas o humanistas se pregunten por los mecanismos que le han permitido establecer su propia identidad pensante.

Esta monografía ha conseguido reunir a especialistas del área de neurociencias de nuestro país para una puesta al día de los procesos esenciales del tejido nervioso y su funcionamiento. Dada la amplitud del tema, esta monografía no pretende ser exhaustiva, pero sí dar una visión actual de procesos complejos y abrir nuestro horizonte a los retos que quedan pendientes en el universo neuronal.

El primer capítulo da una visión actual y acertada de un tema que puede considerarse central a la idea del funcionamiento del sistema nervioso, y no es

otro que los mecanismos implicados en la axonogénesis, cómo crece el axón y cómo consigue dirigirse a su destino. Los autores, dos jóvenes investigadores, los doctores Juan José Garrido y Miguel Díaz Hernández, respectivamente del centro CBM Severo Ochoa y de la Universidad Complutense, realizan un excelente trabajo de puesta al día.

El segundo capítulo está dedicado a los canales de comunicación sensorial, TRPs, su importancia en la transducción de estímulos, la gran diversidad y las principales familias, haciendo énfasis en sus posibilidades farmacológicas. El autor es un especialista con renombre internacional en el área, el doctor Antonio Ferrer Montiel, Catedrático de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

El tercer capítulo está dedicado a dar una visión actual de la maquinaria exocitótica y su posible relación con algunas enfermedades neurodegenerativas y ha sido realizado por un gran farmacólogo, el doctor Antonio Rodríguez Artalejo, Catedrático de Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid y su grupo.

El cuarto capítulo, que está dedicado a la neurotransmisión mediada por nucleótidos y las perspectivas terapéuticas en las enfermedades neuronales, ha sido realizado por uno de los coordinadores de la monografía, la doctora M.ª Teresa Miras Portugal, Catedrático de Bioquímica de la Universidad Complutense y el doctor Javier Gualix Profesor Titular de la misma universidad.

El quinto capítulo supone una puesta al día de los aspectos más novedosos de la Fisiopatología de la neurotransmisión glicinér gica inhibidora, tema en el que sus autoras han trabajado con mucho éxito en estos últimos años. La doctora Carmen Aragón es Catedrático de Bioquímica en la Universidad Autónoma de Madrid y la doctora Beatriz López Corcuera es Profesor Titular en la misma universidad.

El sexto capítulo proporciona una visión actual de un nuevo sistema de neurotransmisión, la mediada por los endocannabinoides y los autores son dos de los pioneros en este área de investigación, el doctor Manuel Guzmán, Catedrático de Bioquímica en la Universidad Complutense y el doctor Ismael Galve-Roperh Profesor Titular en la misma universidad.

El séptimo capítulo nos adentra en el complejo mundo de la regulación transcripcional y sobre todo de la dependiente de calcio, ya que esta señal es primordial en el sistema nervioso. Los autores tienen dilatada experiencia en el tema y son los doctores José Ramón Naranjo Profesor de Investigación del Centro Nacional de Biotecnología y la doctora Rosa Gómez Villafuertes investigadora de la Universidad Complutense.

El octavo capítulo nos da una visión de los modelos animales que se pueden emplear para mimetizar las enfermedades neurodegenerativas. Los autores tienen amplia experiencia en este área, sobre todo en relación con la enfermedad de Huntington y son los doctores José Javier Lucas, Profesor de Investigación en el CBM y su colaboradora la doctora Zaira Ortega.

El noveno capítulo presenta la importancia de la proteína tau actuando sobre los receptores muscarínicos, como posible eslabón en la enfermedad de Alzheimer. Esta hipótesis novedosa es desarrollada por el doctor Jesús Ávila, experto en la materia, que es Profesor de Investigación del CBM y su discípulo Alberto Gómez-Ramos.

El décimo capítulo desarrolla una hipótesis novedosa y original sobre el origen de la esquizofrenia, basada en disfunciones de la neurotransmisión glutamatérgica. Los autores, doctores Cecilio Giménez y Francisco Zafra son muy conocidos en este área de investigación y ambos son Catedráticos de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

El undécimo capítulo nos demuestra de modo contundente que ningún tema de investigación es viejo, solo se hacen viejos los humanos investigadores, ya que nadie podía imaginar que una enfermedad asociada a epilepsia, la enfermedad de Lafora, estuviera estrechamente asociada con proteínas que controlan el metabolismo del glucógeno. Los autores han demostrado que la aproximación multidisciplinar enriquece a los que se asocian. El doctor Joan Guinovart es Catedrático de Bioquímica de la Universidad de Barcelona y bien conocido en el mundo del metabolismo del glucógeno, el doctor David Vílchez es investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona y el doctor Santiago Rodríguez de Córdoba es Profesor de Investigación en el CIB.

El duodécimo capítulo nos ofrece una visión novedosa sobre los neurotransmisores implicados en los procesos oculares y su autor es Profesor Titular de la Escuela de Óptica de la Universidad Complutense de Madrid, donde ha formado un competitivo grupo de investigación en procesos oculares y su colaboradora Concepción Santano.

Los coordinadores somos conscientes de la inmensidad del tema y que esta monografía no puede por lo tanto ser exhaustiva, pero estamos seguros de que aportará una nueva visión sobre los temas tratados y suscitará preguntas e inquietud entre los lectores. A los autores y a los lectores damos las gracias por su esfuerzo.

No podíamos finalizar sin hacer explícito nuestro agradecimiento al Instituto de España, pues esta monografía tiene su origen en un ciclo de conferen-

cias en la sede del Instituto de España con el mismo título: «A vances en Neurociencia: Neurotransmisores y patologías nerviosas», que hemos completado con algunos temas específicos. Agradecer igualmente a la Real Academia Nacional de Farmacia y a la Fundación José Casares Gil por su ayuda, y de modo muy especial al doctor Jesús Sánchez Nogueiro por el trabajo de edición de este volumen.

Los Coordinadores:

M.ª TERESA MIRAS PORTUGAL

Antonio Rodríguez Artalejo

Catedrático de Bioquímica. Académico de Número de la RANF Catedrático de Farmacología. Académico Correspondiente de la RANF

1. Mecanismos implicados en la axonogénesis, el crecimiento axonal y la localización de proteínas en el axón

JUAN JOSÉ GARRIDO Y MIGUEL DÍAZ HERNÁNDEZ

RESUMEN

El inicio de la funcionalidad neuronal comienza por la formación de un axón y la generación de dos dominios funcionales, axonal y somatodendrítico. En estos dominios se forman subdominios especializados en la recepción de señales (espinas dendríticas) y la propagación de los impulsos nerviosos (segmento inicial del axón). La formación del axón depende de la activación de vías de señalización como la de PI3-quinasa, LKB1 o NFkB que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina y microtúbulos y la elongación axonal. Además, existen señales que actúan negativamente sobre el crecimiento axonal. Recientemente, hemos demostrado que el ATP y el receptor purinérgico P2X7 forman parte de estas señales negativas y la inhibición farmacológica de P2X7 induce la inhibición de GSK3, la cual está asociada en diferentes trabajos a la elongación y arborización axonal. De hecho, su inhibición o supresión potencian el crecimiento axonal y la arborización del axón. Simultáneamente a la elongación del axón, se forma el segmento inicial del axón, responsable de generar los potenciales de acción. Recientemente, describimos un motivo aminoacídico capaz de localizar proteínas de membrana y canales iónicos en dicha región. Esto es posible gracias a mecanismos de transporte dirigidos por los microtúbulos y la kinesina-1 y a mecanismos de anclaje específicos del segmento inicial del axón. El conocimiento de estos mecanismos moleculares ha permitido encontrar dianas terapeúticas que deberan ser estudiadas para el tratamientos de enfermedades neurodegenerativas y relacionadas con el crecimiento del axón y su funcionalidad.

Palabras clave: Segmento inicial del axón. Citoesqueleto. Polaridad neuronal. Receptores purinérgicos. Arborización axonal.

ABSTRACT

Mechanisms involved in axon formation, axonal elongation and protein targeting at the axon

The begging of neuronal functionality starts by the formation of an axon, and the generation of two functional domains, axonal and somatodendritic. Specialized subdomains are formed in these domains to receive signals (dendritic spines) and to propagate nerve impulse (axonal initial segment). Axon formation depends on the activation of signalling pathways, such as PI3-kinase, LKB1 or NFkB, which regulate the dynamics of actin and microtubule cytoskeleton, and so, axonal elongation. Besides, there are signals that act negatively on axonal growth. Recently, we have demonstrated that ATP and the purinergic receptor P2X7 form part of these signals and the pharmacological inhibition of P2X7 induces GSK3 inhibition. GSK3 inhibition has been related in several Studies to axonal elongation and axonal branching. In fact, inhibition of P2X7 or its suppression potentiates axonal growth and branching. Simultaneously to axonal elongation, the axon initial segment is formed. This domain is responsible for action potential generation. Recently, we have described a targeting motif capable of localizing membrane proteins and ionic channels to the axon initial segment. This protein targeting is due to transport mechanisms involving microtubules and kinesin-1, as well as, tethering mechanisms specific of the axon initial segment. A better knowledge of these molecular mechanisms has allowed the finding of new therapeutic targets that should be studied for the treatment of neurodegenerative diseases and diseases affecting axonal growth and its correct function.

Keywords: Axonal initial segment. Cytoskeleton. Neuronal polarity. Purinergic receptors. Axonal branching.

INTRODUCCIÓN

Nuestros movimientos, las percepciones sensoriales de lo que ocurre a nuestro alrededor y la generación de una respuesta a ellas dependen de una compleja red de neuronas en nuestro sistema nervioso central y periférico. Santiago Ramón y Cajal fue el primero en postular la existencia de la neurona como una unidad básica de funcionamiento del cerebro. Además, propuso en su ley de polarización dinámica que la transmisión del movimiento nervioso se produce siem-

pre desde las ramas protoplásmicas y cuerpo celular, al axón o expansión funcional, y que toda neurona posee, pues, un aparato de recepción, el soma y las prolongaciones protoplásmicas (dendritas), un aparato de emisión, el axón, y un aparato de distribución, la arborización nerviosa terminal (1, 2). Con esta idea, Ramón y Cajal abrió dos cuestiones que están plenamente de actualidad, cómo se adquiere la morfología de una neurona y cuáles son los mecanismos celulares y moleculares que permiten la transmisión del impulso nervioso de una neurona a otra. Esta revisión pretende abordar algunos de los avances más importantes que se han producido en el campo de la polaridad neuronal en estos últimos años.

Diversos avances técnicos, entre ellos, modelos de cultivo de neuronas han permitido estudiar de una forma más precisa la morfogénesis neuronal. En la actualidad, conocemos con una mayor precisión que el primer fenómeno en el establecimiento de la polaridad neuronal es la formación de un axón, antes incluso que se desarrollen las otras neuritas como dendritas. En dicha formación están implicadas al menos dos rutas de señalización, la ruta de PI3-quinasa y una ruta menos conocida en la que juega un papel importante la proteína LKB1 («tumor suppressor kinase Lkb1»). Estas rutas regulan la dinámica del citoesqueleto de actina y microtúbulos, el cual juega un papel esencial tanto en el crecimiento del axón como en el transporte al axón de las proteínas de membrana que van a permitir la conducción del impulso nervioso. Dicho impulso se genera en respuesta a las señales recibidas por las dendritas, se integra en el segmento inicial del axón, generando el potencial de acción y se transmite a lo largo del axón hasta llegar a la región presináptica. Para que esta maquinaria funcione correctamente cada dominio de la neurona (somatodendrítico, segmento inicial del axón y axón) debe cumplir su función específica y para ello necesita un conjunto propio y específico de proteínas funcionales (receptores de neurotransmisores, canales iónicos y proteínas capaces de anclar las anteriores en una posición concreta). Por tanto, la desregulación a cualquier nivel de señalización del citoesqueleto, la ausencia o falta de función de las proteínas anteriormente mencionadas, así como una localización imprecisa de estas proteínas puede generar una disfunción de la red de neuronas, generando enfermedades neurodegenerativas o mentales.

1. ADQUISICIÓN DE LA POLARIDAD NEURONAL: FORMACIÓN DEL AXÓN

La neurona es una de las células con una mayor complejidad morfológica y funcional. La adquisición de esta complejidad comienza con la especificación de una de las neuritas como axón y su crecimiento. De este modo,

la neurona adquiere su polaridad morfológica, diferenciando un dominio somatodendrítico (postsináptico) y un dominio axonal (presináptico). Los mecanismos intracelulares que regulan la especificación del axón y su posterior crecimiento son aún poco conocidos. A pesar de los datos conocidos sobre la morfogénesis neuronal *in situ*, la comprensión de los mecanismos intracelulares que regulan la neuritogénesis y la formación del axón requieren sistemas experimentales donde las neuronas puedan ser manipuladas durante su diferenciación. La generación de un modelo estandarizado de cultivo de neuronas de hipocampo, con estadios definidos, ha permitido avanzar en el estudio de los mecanismos moleculares responsables de la formación del axón y su elongación (Figura 1). En este modelo las neuronas reproducen los cambios morfológicos y funcionales que se observan en las neuronas in situ y su contribución a la investigación de la función neuronal ha sido de gran importancia (3-5).

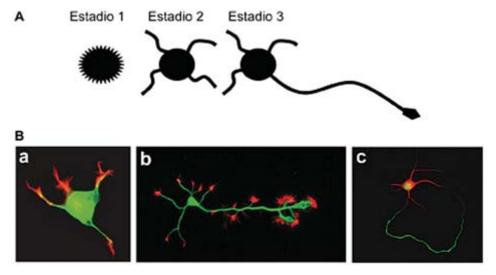


Figura 1. Modelo de adquisición de la polaridad neuronal. (A) Esquema representativo de los estadios de diferenciación neuronal en el modelo de neuronas de hipocampo en cultivo. (B) En el panel inferior se muestran ejemplos de estas neuronas en estadio 2 (a) y estadio 3 (b y c). En el estadio 2 (a), el axón aún no ha comenzado a crecer y se distinguen varias neuritas que crecen a partir del soma, con conos de crecimiento marcados con Faloidina-Alexa 594 (rojo), mientras que los microtúbulos se marcaron con anti-α-tubulina y un anticuerpo secundario Alexa-488 (verde). En el estadio 3, se observa como el axón ha comenzado a crecer a un mayor ritmo que el resto de neuritas. El patrón del citoesqueleto de microtúbulos y actina se marcó como en a. En c se muestra la diferenciación del citoesqueleto de microtúbulos entre el dominio somatodendrítico (MAP2, rojo) y el dominio axonal (MAP1B fosforilada (SMI-31, verde).

1.1. Ruptura de la neuroesfera y crecimiento de neuritas

Tras la última división, la neurona postmitótica presenta una forma redondeada. En las fases más tempranas, en cultivo, genera un lamelipodio de actina polimerizada a su alrededor (estadio 1). El primer paso en la ruptura de esta simetría es la concentración, en uno o varios puntos, de receptores de factores y proteínas que regulan la polimerización de actina. Se ha descrito que la detección de una señal positiva de crecimiento a través de receptores de membrana transforma RhoA-

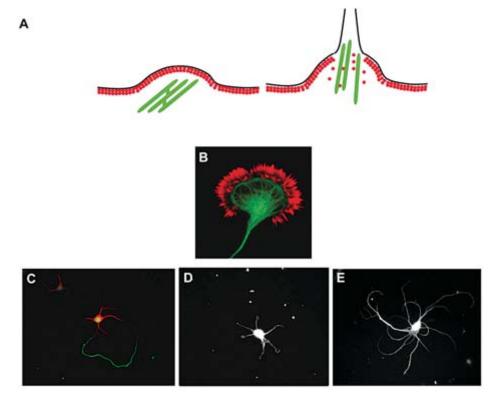


Figura 2. La ruptura de la barrera de actina es necesaria para el crecimiento de neuritas y el axón. (A) El crecimiento de las neuritas a partir del estadio de neuroesfera y su posterior elongación requieren de la despolimerización de los microfilamentos de actina (rojo) y la ruptura de la barrera de actina. Esto es aprovechado por los microtúbulos (verde) para invadir esta región y promover el crecimiento de las neuritas. (B) Inmunofluorescencia de un cono de crecimiento axonal en sus primeras etapas donde se observa la barrera de actina con su estructura de lamelipodio y filopodios (rojo) y el citoesqueleto de microtúbulos (verde). En comparación con el crecimiento de las neuronas control (C), la estabilización del citoesqueleto de actina mediante el uso de jasplakinolide (D) impide el crecimiento de las neuritas, mientras que su despolimerización con cytochalasina D permite el crecimiento de multiples neuritas («axon-like»).

GTP a su forma inactiva, RhoA-GDP. Esta inactivación rompe el complejo de RhoA-ROCK-Profilina e induce la despolimerización de actina en este punto concreto (6). Otra proteína asociada a actina que participa en la despolimerización de la actina es la cofilina (7). Esta ruptura de la barrera de actina es utilizada entonces por los microtúbulos para crecer y generar las neuritas (estadio 2, Figura 2). La regulación del citoesqueleto de actina durante el crecimiento neurítico y axonal es aún poco conocida. Además de la regulación de la dinámica de ensamblaje de los filamentos de actina, su nucleación también juega un papel importante en los mecanismos de crecimiento y motilidad neuronal. Quizás el factor de nucleación más conocido es Arp2/3 (8), que necesita de la colaboración de otros factores como WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) y cuya actividad es regulada por miembros de la familia de Rho-GTPasas (9).

1.2. Rho-GTPasas y su relación con el crecimiento de neuritas

Los miembros más conocidos de la familia de Rho-GTPasas son RhoA (Rashomologous member A), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) y Cdc42 (cell-division cycle 42). Las Rho-GTPasas son proteínas que se expresan de forma ubicua y están presentes a lo largo de toda la filogenia. La microinyección de formas constitutivamente activas o dominantes negativos de estas GTPasas ha permitido conocer sus funciones en el control del citoesqueleto de actina. Estas proteínas presentan una forma activa, unida a GTP, y una forma inactiva, unida a GDP. El intercambio de GDP a GTP, y viceversa, está regulado por otras familias de proteínas, GAPs, GEFs y GDIs que regulan este intercambio o lo inhiben (10). Como se ha mencionado anteriormente, el crecimiento de neuritas y con posterioridad del axón depende de la inactivación de RhoA, siendo además esencial la actividad de Rac1. Las Rho-GTPasas regulan el citoesqueleto de actina uniéndose a proteínas asociadas a actina (forminas, WASP, profilina, cofilina, etc.) en función de su estado de actividad y regulando de esta forma la generación de filamentos de actina, su despolimerización y la orientación de estos microfilamentos de actina.

Existe una clara relación entre los citoesqueletos de actina y microtúbulos durante el crecimiento y movimiento celular, aunque no existen muchos datos sobre ello. Un trabajo ha propuesto que RhoA tiene un papel dual en la estabilización y desestabilización de microtúbulos, que Rac1 incrementa el crecimiento de microtúbulos y Cdc42, además de cooperar con Rac1, está implicado en la reorientación del centrosoma hacia la dirección de migración (11).

1.3. Formación del axón y elongación axonal

La adquisición de la polaridad neuronal comienza con la formación de un axón a partir de una de las neuritas generadas (estadio 3). El crecimiento del axón a un mayor ritmo que el resto de neuritas requiere la concentración de mecanismos de regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, así como de mecanismos de transporte específicos del axón. Se ha descrito que el punto de crecimiento del axón depende de la posición del centrosoma tras la última división (12), lo que supondría un apoyo a la organización de los microtúbulos, su crecimiento y el transporte de proteínas axonales. Sin embargo, el estudio del crecimiento del axón en el modelo de cultivo de neuronas de hipocampo no muestra una relación entre la posición del centrosoma y el punto de crecimiento del axón. Recientemente, un trabajo sugiere que el axón se forma a partir de una de las dos primeras neuritas generadas (13). Si bien, este punto aún necesita de nuevos estudios para determinar con claridad dónde se forma el axón, los mecanismos que lo generan y las proteínas asociadas con la formación del axón son un poco más conocidos.

1.3.1. Función de PI3-quinasa en la formación del axón

Utilizando el modelo de neuronas de hipocampo en cultivo se ha descrito que la actividad de PI3-quinasa es esencial para formar un axón (14). Dicha actividad genera PI₂P fosfo-inosítidos que regulan la localización polarizada, en el extremo de la neurita que se especifica como axón, de proteínas como mPar3 y mPar6. Además, la actividad de PI3-quinasa activa otras proteínas (p. ej. PKCz, Akt, GSK3, Rap1b, Rac1 y Cdc42) relacionadas con el citoesqueleto de actina y microtúbulos que permiten la elongación del axón (15). La actividad coordinada de estas proteínas y sus vías de señalización permiten una mayor despolimerización del citoesqueleto de actina en el punto de crecimiento del axón y la polimerización de microtúbulos que elongan el axón. La importancia de la despolimerización localizada de actina para permitir el crecimiento del axón fue demostrada por el grupo de Carlos Dotti (16). Tratando neuronas de hipocampo en cultivo con cytochalasina D observaron que su aplicación local, en otra neurita diferente a la que había generado el axón, permitía el crecimiento de un segundo axón (Figura 2). Posteriormente, se ha demostrado que proteínas asociadas a la actina, como la profilina, actúan conjuntamente con las proteínas de la familia de Rho-GTPasas, regulando el estado de polimerización de la actina en el punto de crecimiento del axón. En general, el crecimiento del axón depende de un balance a favor de una mayor cantidad de Rac-GTP y una mayor inactividad de Rho (Rho-GDP).

1.3.2. Otras proteínas relacionadas con la formación del axón

La importancia de la vía de PI3-quinasa en la formación del axón no sólo se refiere a la actividad de PI3-quinasa. Recientemente, se ha descrito que otras quinasas reguladas por esta activad son esenciales para la formación o especificación del axón. La inhibición de la actividad de GSK3 impide la formación del axón (17, 18). Aunque durante mucho tiempo se ha puesto énfasis en GSK3B, mediante el uso de ARNs de interferencia se ha podido demostrar que además de GSK3β, GSK3α? también es necesaria para la formación del axón en neuronas de hipocampo durante su desarrollo «in vitro» (17). Sin embargo, la elongación posterior del axón es acentuada por la inhibición de la actividad de GSK3 (17, 19). Algunos artículos han descrito que la inhibición de GSK3 también genera múltiples axones, pero dada la compleja regulación de esta proteína y su participación en diferentes procesos celulares, harán falta más estudios para entender de una forma más concreta su participación en la formación del axón (20, 21). La regulación de la actividad de GSK3 es bastante compleja y se conoce mejor su actuación fosforilando proteínas asociadas al citoesqueleto. La fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos como tau o MAP1B regula la estabilidad y polimerización de microtúbulos, participando de esta forma en la regulación del crecimiento axonal. De hecho, las neuronas de hipocampo de ratones con una expresión muy reducida de MAP1B presentan un retraso importante en el crecimiento inicial del axón (22-24). MAP1B fosforilada por GSK3 se localiza esprecificamente en el axón y es un marcador temprano durante la formación del axón (25). Con posterioridad, la forma de tau no fosforilada por GSK3, tau-1, se localiza específicamente en el axón. Por tanto, GSK3 tiene un papel diferente dependiendo del momento de desarrollo del axón (especificación o elongación). CRMP-2 es una proteína regulada por GSK3 y que actúa polimerizando microtúbulos y permitiendo el crecimiento del axón. CRMP-2 se une a monómeros de tubulina que va incorporando al extremo positivo de los polímeros de tubulina. Su sobreexpresión en neuronas genera múltiples axones (26-28).

GSK3 también fosforila a beta-catenina (29), la cual participa en el crecimiento axonal asociada a APC y al citoesqueleto (30). La regulación de la fosforilación de beta-catenina por GSK3 también juega un papel importante en el transporte de beta-catenina al núcleo y su participación en la transcripción de genes (29). Como posteriormente se tratará, un tipo de receptores capaces de interactuar con la actividad de GSK3 y regular la elongación del axón y su arborización, son los receptores purinérgicos. Otros receptores que regulan la actividad de GSK3 y que han sido más estudiados son los receptores de insulina

e IGF-I, cuya supresión mediante ARN de interferencia impide la formación del axón (31).

Además de GSK3, la actividad de IKKα/IKKβ (Quinasa del inhibidor de NF-κΒ, IκΒα) es necesaria para formar un axón. Recientemente, hemos demostrado que la supresión de la actividad de IKKs impide la formación del axón (32). Sin embargo, al igual que ocurre con GSK3, una vez establecido el axón, la actividad de IKKs no es necesaria para elongar el axón, aunque si juega un papel muy importante en la formación y maduración del segmento inicial del axón. Esta región aloja una importante concentración de canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v1.2 y Na_v1.6) y es responsable de la generación del potencial de acción. Diferentes trabajos han mostrado que existe una interrelación entre la actividad de GSK3 y la ruta de señalización de NFκΒ, pero la forma en que interaccionan en las neuronas no es aún conocida (33).

Otra vía de señalización implicada en la formación del axón, y por el momento no asociada con la actividad de PI3-quinasa, implica a la proteína LKB1 (Par4). Se ha demostrado que la fosforilación en la serina 431 de LKB1 por PKA es necesaria para que se forme un axón (34).

Asimismo, otras proteínas reguladas por diferentes vías están implicadas en los mecanismos responsables de formar el axón. Por ejemplo, la forma fosforilada de JNK2 está presente en la región distal del axón y dicha fosforilación es necesaria para formar el axón (35). Recientemente, se ha propuesto que Rit, perteneciente a la familia de Ras GTPasas está implicada en el crecimiento del axón y su actividad además de promover el crecimiento axonal, puede actuar como un factor inhibidor del crecimiento de las dendritas (36). Otras proteínas relacionadas previamente con el transporte de proteínas hacia el axón se han identificado en las primeras fases de especificación y crecimiento axonal. Una de ellas es una subunidad de la kinesina-1, cuya localización en la neurita que va a formar axón determina su crecimiento (37). Esta subunidad de la kinesina-1 se localiza con posterioridad en el segmento inicial del axón y su asociación con microtúbulos estables en este dominio determina el transporte y localización axonal de proteínas como la proteína precursora del amiloide (APP) (38).

1.4. Formación del segmento inicial del axón

El segmento inicial del axón (AIS) fue identificado en los años 60 como una estructura que se diferenciaba estructuralmente del resto del axón y del dominio somatodendrítico. Sus principales características son: a) una capa densa

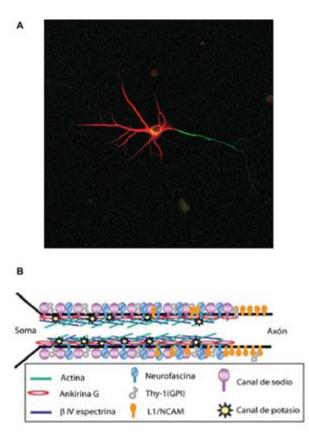


Figura 3. El segmento inicial del axón. (A) Neurona de hipocampo en cultivo (6 DIV). El dominio somato-dendrítico se identificó mediante el marcaje con anticuerpos dirigidos contra la proteína asociada a microtúbulos, MAP2a+b (rojo), y el segmento inicial del axón utilizando anticuerpos dirigidos contra losa canales de sodio dependientes de voltaje (PanNaCh, verde). (B) Esquema representativo de la estructura proteica del segmento inicial del axón. Sobre un citoesqueleto denso de actina submembranoso se anclan proteínas como la βIV-espectrina y la ankirina G, que a su vez ancla proteínas integrales de membrana como los canales de sodio, canales de potasio, neurofascina o L1/NCAM. Esta densidad de proteínas actúa como barrera de difusión en la membrana, controlando el tráfico de proteínas hacia el axón.

granular e intracelular, b) la presencia de algunos grupos de ribosomas, y c) la presencia de fascículos de microtúbulos. Esta estructura se asemeja a la de los nodos de Ranvier (39). Durante muchos años, algunos estudios aislados han seguido describiendo la estructura del segmento inicial del axón en diferentes tipos de neuronas y en diferentes especies. Sin embargo, este dominio axonal sólo ha adquirido una relevancia especial en la funcionalidad neuronal durante los últimos 10 años (Figura 3).

El segmento inicial del axón es la estructura responsable de la generación del potencial de acción y actúa también como una barrera de difusión que controla el tráfico de proteínas hacia el axón (40, 41). La generación del potencial de acción es posible gracias a la concentración de canales de sodio dependientes de voltaje en este dominio axonal (42, 43). Dicha concentración es posible gracias a su anclaje a ankirina G en el segmento inicial del axón a través de la secuencia AIS de aminoácidos presente en el canal de sodio (42). El AIS actúa también como una barrera que impide el tráfico hacia el axón de proteínas que no van a formar parte del axón. Ello es posible gracias a una fuerte concentración de proteínas en la membrana del AIS que limita la difusión de proteínas (44).

Dada la importancia del segmento inicial del axón en la adquisición de la polaridad funcional de las neuronas, diversos grupos han estudiado como se forma su estructura. Estudios en secciones de cerebro de ratones salvajes y ratones knock-out para ankirina G y \(\beta \text{IV-espectrina} \) han mostrado que la concentración de canales de sodio en el AIS depende de la llegada con anterioridad de ankirina G y βIV-espectrina (45). Dos estudios han mostrado que existe una secuencia de aminoácidos en el canal de sodio neuronal dependiente de voltaje que es responsable de concentrar estos canales en el segmento inicial del axón y que dicha secuencia une estas proteínas a la ankirina G (42, 46). Esta secuencia ha sido con posterioridad identificada en otros canales iónicos, como los canales de potasio KCNQ2/3 (Kv7.2 y Kv7.3), que están relacionados con epilepsias neonatales (47). Además, la mutación de un glutámico en esta secuencia de aminoácidos impide la concentración de proteínas, su anclaje a ankirina G y cuando la mutación está presente en el canal de sodio dependiente de voltaje de músculo cardiaco (Nav1.5), entonces se produce la cardiomiopatía conocida como el síndrome de Brugada (48, 49).

El anclaje de ankirina G y β IV-espectrina necesita a su vez de una estructura de citoesqueleto diferenciada del resto del axón. Así, el segmento inicial del axón se caracteriza por una densidad elevada de actina bajo su membrana plasmática. El uso de agentes despolimerizantes de actina reduce la amplitud del potencial de acción (43). Asimismo, observaciones de nuestro laboratorio y de otro grupo (50) muestran que los microtúbulos del segmento inicial del axón presentan isoformas de tubulina más estables (tubulina acetilada) y su organización es diferente a la del resto del axón o el dominio somatodendrítico.

Estos microtúbulos más estables juegan un papel esencial en el transporte de proteínas hacia el axón, al permitir la unión de la subunidad KIF5B de la kinesina-1 que actúa como proteína de transporte hacia el axón (38). Otra subunidad de la kinesina-1, KIF5C, se une de forma diferencial a microtúbulos ti-

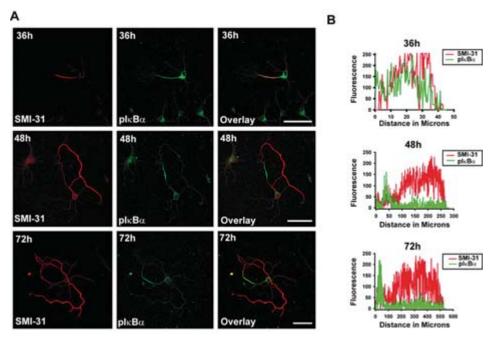


Figura 4. La formación del segmento inicial del axón está asociada a la formación inicial del axón. (A) Neuronas de hipocampo cultivadas durante 36, 48 ó 72 horas y marcadas con anticuerpos dirigidos contra el marcador axonal SMI-31 (MAP1B-P, rojo) y pIkBa (verde). (B) Como se observa en la cuantificación de fluorescencia de ambos marcadores colocalizan en el axón desde su inicio y posteriormente pIκBα se concentra en el segmento inicial del axón (48 y 72 horas).

rosinados (más dinámicos) y a microtúbulos detirosinados (más estables), siendo la velocidad de transporte más lenta en estos últimos (51). Esta diferencia permitiría al segmento inicial del axón cumplir su función de control de tráfico de las proteínas axonales.

Recientemente, hemos demostrado que la formación del segmento inicial del axón es un evento mucho más temprano de lo que se pensaba y no es necesaria una previa maduración dendrítica (32). La forma fosforilada del inhibidor de NF- κ B, pI κ B α , se localiza en el segmento inicial del axón de todas las neuronas e interneuronas en el sistema nervioso central (52). Cuando estudiamos la formación del axón en el modelo de neuronas de hipocampo en cultivo, se observó que desde el primer momento que el axón puede ser identificado como tal, la localización de pI κ B α está restringida al incipiente axón. Según el axón comienza a elongar pI κ B α se comienza a concentrar próximo al axón (Figura 4) y unas 24 horas tras la iniciación del axón, el segmento inicial del axón se ha formado (32).

Aunque los mecanismos que regulan el transporte de proteínas hacia el segmento inicial del axón son poco conocidos y se ha propuesto que la ankirina G es la primera proteína en llegar al segmento inicial del axón, nuestro estudio ha mostrado que la fosforilación de IkB α es necesaria para el transporte de ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje hacia el axón (32). pIkB α se asocia a microtúbulos y podría de esta forma regular el transporte de proteínas hacia el axón. Esto supone la implicación de una ruta de señalización tanto en el control de la transcripción de genes como el transporte de las proteínas que estos codifican, siendo de esta forma un mecanismo de coordinación a nivel intracelular de los mecanismos que regulan la morfogénesis y la síntesis de proteínas. Futuros estudios en esta dirección podrían ser útiles para comprender enfermedades del sistema nervioso relacionadas con la pérdida de estructuras en las neuronas.

2. ELONGACIÓN Y ARBORIZACIÓN AXONAL

El axón, una vez formado, debe elongar y alcanzar dianas específicas para generar contactos sinápticos con otras neuronas o células especializadas en diferentes tejidos (p. ej. musculares o sensoriales). Esta elongación está regulada por señales externas positivas y negativas que regulan el crecimiento y guían al axón hacia su diana. Diversos estudios han mostrado que la ramificación axonal está ligada al comportamiento del cono de crecimiento (53, 54). Por ejemplo, la semaforina 3A repele los axones corticales in situ e in vitro (55, 56) y reduce la arborización axonal (55). Por otro lado, esta misma molécula repele los conos de crecimiento de las neuronas de retina pero induce la ramificación de estos axones una vez que el cono de crecimiento se ha recuperado de su colapso (57). Para ello el cono de crecimiento axonal cuenta con receptores de estas señales que están acoplados a mecanismos de regulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, tales como las neuropilinas, plexinas o integrinas (58). Estos factores pueden regular la dinámica de los microfilamentos de actina o microtúbulos en zonas específicas del cono de crecimiento, permitiendo su giro hacia una u otra dirección o incluso el colapso del cono de crecimiento. La neurona, a través del conjunto de receptores y sensores en su cono de crecimiento, realiza exploraciones y crece en la dirección permitida o colapsa ese cono de crecimiento si el ambiente no permite el crecimiento, impidiendo de esta forma la generación de ramificaciones axonales. En ciertas condiciones, el axón puede ramificarse y generar multiples ramificaciones (arborización axonal) con múltiples contactos sinápticos. La formación de ramificaciones axonales es necesaria para el desarrollo del sistema nervioso y a su vez, el tamaño y complejidad de las ramificaciones está determinado por la actividad neural (59, 60). Para que estas ramificaciones se produzcan el citoesqueleto debe remodelarse. Así, el axón a partir del cual se generan las ramificaciones está formado por largos microtúbulos que deben cortarse y moverse hacia la ramificación en formación. Esto es posible gracias a proteínas como la katanina o la spastina que rompen estos microtúbulos en fragmentos más pequeños y móviles (61). La regulación del crecimiento de estas ramificaciones y su extensión con respecto al axón principal depende de diferentes señales. Sin embargo, las bases moleculares que regulan la arborización axonal son poco conocidas. Recientemente se ha descrito, que modificaciones localizadas transitorias de los niveles de calcio intracelular pueden estar implicadas en la toma de esta decisión (62).

Estas variaciones en los niveles de calcio, junto con las vías de señalización dirigidas por otros factores externos pueden regular ese crecimiento y arborización axonal. Recientemente se ha descrito que NGF potencia el crecimiento axonal en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (DRG) e induce la inhibición de GSK3. Además, la inhibición de GSK3, en neuronas de hipocampo en cultivo, induce el crecimiento y la arborización axonal (17). Además de GSK-3, tanto RhoA como FAK («focal adhesion kinase») juegan un papel esencial en la regulación de la formación de ramificaciones axonales (63, 64).

Además de las señales que inducen el crecimiento y la arborización axonal, otras señales, como el ATP, pueden impedir o restringir el crecimiento del axón. Como se discute a continuación, los receptores purinérgicos pueden jugar un papel importante en la regulación de la elongación y arborización del axón, aunque su papel en el desarrollo de los circuitos neuronales es aún muy poco conocido.

3. FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

Una de las familias de moléculas que más importancia está adquiriendo en los últimos años por el papel que desempeñan en la diferenciación y supervivencia neuronal son los nucleótidos de adenina. Estos compuestos, que presentan una amplia distribución en todo el organismo, ejercen un efecto trófico directo en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y juegan un papel fundamental en el las respuestas frente a enfermedades y traumatismos (65, 66). Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores los nucleótidos de adenina, y en particular el ATP, ejercen un papel como neurotransmisor rápido en el sistema nervioso central, ya que solo no activa canales iónicos específicos denominados receptores P2X (67-69), sino que además, las ectonucleotidasas

presentes en la membrana plasmática lo degradan rápidamente a adenosina. Los receptores P2X, están formados por la combinación de al menos 7 subunidades diferentes denominadas P2X1 al P2X7, y conforman un canal funcional cuando se combinan al menos 3 de estas subunidades iguales o diferentes (70). La activación de estos receptores induce la entrada de calcio al interior de la neurona independiente de la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (71). Como consecuencia de esta entrada de calcio, el ATP, es capaz de inducir la liberación de más neurotransmisores, participando así en la propagación del impulso nervioso (72, 73). Además, estos receptores, al inhibir la inducción de la potenciación a largo plazo en el hipocampo, participan en los procesos de plasticidad neuronal, fundamentales en el funcionamiento de los circuitos neuronales implicados en los procesos de memoria (74).

Es precisamente durante el desarrollo del hipocampo donde los receptores P2X juegan un papel importante en la formación de las redes neurales. Así, en estudios realizados en rodajas de hipocampo de ratones neonatos, se observó que la activación de los receptores P2X1, 2 y 4 inducen la formación de fibras nerviosas en el giro dentado (75). Por el contrario, en explantes neuronales se ha descrito que la activación de receptores P2X3 desencadena una disminución de la elongación axonal (76).

La importancia que los nucleótidos de adenina desempeñan en la diferenciación neuronal no solo se limita a los efectos que estos compuestos ejercen sobre la morfología neuronal. Así, otro de los papeles importante que desempeñen los nucleótidos de adenina se centra en el control que células progenitoras poseen para controlar la recepción de las señales procedentes de su entorno (77). Uno de estos mecanismos de control consiste en la alta expresión de ectonucleotidasas en su membrana plasmática, impidiendo de esta manera la llegada de señales que las induzca a diferenciarse (78).

El control que los nucleótidos ejercen sobre los sistemas en crecimiento parece no limitarse al reino animal. Así, recientemente se ha descrito como el ATP y la ectonucleotidasas presentes en la raíz de la planta *Arabinopsis thaliana* ejercen una fuerte regulación sobre su crecimiento y ramificación (79).

3.1. Calcio y crecimiento axonal

Hace unos años, se reportó por primera vez la influencia que el calcio ejercía en los proceso de elongación y ramificación axonal. Así se observó que los incrementos de calcio espontáneos (por lo tanto, producidos por agentes desconocidos)

que se producen en el cono de crecimiento están inversamente relacionados con la capacidad que tiene el axón de migrar y crecer (80, 81). Al analizar en profundidad este fenómeno, se determinó que únicamente los incrementos de calcio de baja frecuencia son capaces de inducir la parada del crecimiento y arborización axónica (62). No debemos olvidar que el efecto primario que inducen los nucleótidos de adenina, al activar sus receptores P2X, es incrementar el calcio intracelular en un punto muy concreto de la neurona. De tal manera, que si estos receptores estuvieran presentes en los conos de crecimiento serían unos excelentes candidatos para ser los agentes causantes de desencadenar los incrementos de calcio espontáneos antes descritos. Si bien existe poca literatura al respecto, no debemos olvidar que los conos de crecimiento son las estructuras primigenias que constituirán el componente presináptico de los contactos sinápticos que se establezcan en los circuitos neurales del cerebro en un animal adulto. Es precisamente en esta localización donde se ha descrito ampliamente la presencia de los receptores de nucleótidos (82-84) y establecido que su activación no solo induce la entrada de calcio a la terminal nerviosa, sino que también, inducen la liberación de los neurotransmisores almacenados en las vesículas sinápticas (73, 85).

Como se mencionará en el capitulo de esta monografía dedicado al sistema purinérgico, de todas las subunidades P2X encontradas a nivel presináptico, la que presenta una mayor abundancia en el SNC es la subunidad P2X7 (86).

3.2. Los receptores P2X y su función en la regulación del crecimiento axonal

Llegados a este punto, la principal pregunta que queda por esclarecer es si los receptores P2X regulan el crecimiento axonal. Para contestarla, el primer punto que debíamos establecer es la presencia de receptores ionotrópicos funcionales de ATP en los conos de crecimiento. Gracias a la utilización de un sistema de videoimagen que nos permite registrar pequeñas variaciones en la concentración de calcio intracelular en puntos muy concretos de la neurona, observamos que la estimulación de las neuronas de hipocampo en cultivo con pulsos de ATP, producía una entrada de calcio en el cono de crecimiento. Además, pudimos constatar que la onda de calcio generada se quedaba restringida a la zona más distal del axón, sin llegar a afectar ni siquiera a la zona del segmento inicial del axón (Figura 5). También constatamos como la activación de los receptores P2X presentes en el cono de crecimiento provocan una disminución de la elongación del axón (Figura 5). Estas observaciones no solo identifican al ATP como uno de los agentes causantes de los incrementos de calcio espontáneos registrados en los co-

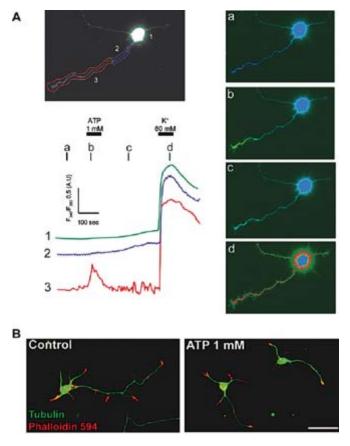


Figura 5. El ATP induce corrientes de calcio en el cono de crecimiento de neuronas de hipocampo en cultivo a través de receptores P2X: A, Imagen de fluorescencia de una neurona hippocampal en cultivo cargada con la sonda fluorescente fura-2. Además se muestran las diferentes áreas analizadas tanto a lo largo del axón (regiones 2 y 3) como en el compartimiento somato-dendrítico (región 1). Las gráficas representan el ratio de los cambios temporales en las longitudes de onda emitidas por el fura-2 al ser este excitado a 340 (F₃₄₀) o a 380 (F₃₈₀) nm. La neurona fue estimulada con un pulso de ATP 1mM en el punto b, y con otro de KCl 60 mM en el punto d. Los paneles que se muestran en la derecha se corresponden con las imágenes de fura registradas para la neurona analiza en los puntos temporales indicados como a al d, que se muestran en las gráficas de la izquierda. Los tiempos de estimulación se representan con líneas sólidas y corresponden a 50 segundos. B, Neuronas hipocampales en su tercer día de cultivo en presencia o ausencia de ATP 1 mM. Las neuronas fueron teñidas con anticuerpos frente a la tubulina (verde) y con la actina (rojo). Escala (50 μm).

nos de crecimiento de las neuronas en cultivo, sino que además, constituyen las primeras evidencias funcionales que demuestran que los receptores P2X ejercen un control negativo de la elongación axonal.

3.2.1. Papel del receptor P2X7 en la regulación del crecimiento axonal

El siguiente paso a analizar era determinar que tipo de receptores P2X estaban involucrados en el control de la elongación del axón. Para contestar esta pregunta, se optó por realizar un estudio farmacológico, empleando diferentes antagonistas de los receptores P2X. Mediante este abordaje experimental no solo conoceríamos la naturaleza del receptor, sino que también determinaríamos si el bloqueo de estos receptores induce la elongación del axón. De todos los antagonistas utilizados, solamente aquellos que inhiben al receptor P2X7, como son el BBG, el KN62 y el A-438079 indujeron una elongación y ramificación del axón mayor a la observada en las neuronas no tratadas (Figura 6). Confirmamos de la participación del receptor P2X7 mediante el empleo de técnicas de biología molecular, gracias a las cuales pudimos observar la evolución del crecimiento y ramificación axonal en neuronas que carecían o sobre-expresaban el receptor P2X7. Como se observa en la Figura 6, la supresión del receptor P2X7 indujo una elongación y ramificación axonal similar a la obtenida mediante los tratamientos farmacológicos en los que se emplearon antagonistas selectivos del receptor P2X7. Por el contrario, la sobre-expresión de dicho receptor indujo una disminución en la longitud y número de ramificaciones del axón, el mismo efecto observado al activar el receptor P2X7 con ATP (Figura 6).

Una vez determinada la participación del receptor P2X7 en el crecimiento y ramificación axonal solo quedaba determinar el mecanismo molecular por el cual dicho receptor regula negativamente la elongación y ramificación axonal. Al analizar en detalle la morfología que presentaban los conos de crecimiento después de activar o inhibir el receptor P2X7 observamos que si bien la activación del receptor promovía un colapso de los mismos, su inhibición inducía el efecto opuesto (Figura 7). Este hecho correlacionó con una activación la proteína FAK (quinasa de los puntos focales de adhesión) mediada por la inhibición de la proteína quinasa dependiente de calcio CaMKII (87). No debemos olvidar que uno de las proteínas dianas del receptor P2X7 es la CaMKII (88, 89), de tal manera que se ha descrito como la activación de P2X7 induce una fuerte y rápida activación de la quinasa dependiente de calcio CaMKII.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las quinasa claves en los procesos de elongación y arborización del axón, es GSK3. Así, se ha descrito que la inhibición sostenida de GSK3 es capaz de inducir una mayor elongación y arborización axonal, una vez que el axón ya esta formado (17). Como cabría esperar, cuando se analizó el estado de activación de la GSK3 después de inducir una inhibición sostenida del receptor P2X7, se observó una clara dismi-

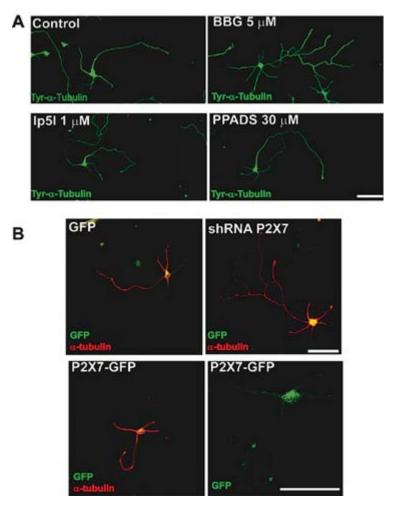


Figura 6. El receptor P2X7 regula el crecimiento y arborización axonal. A, Se muestran neuronas de hipocampo en su tercer día de cultivo tratadas en presencia de diferentes antagonistas de los receptores P2X; BBG (5 μM), PPADS (50 μM) e Ip_sI (1 μM). Las neuronas fueron teñidas con anticuerpos frente a la tubulina para observar su morfología. Escala (100 μm). B, Se muestran neuronas hipocampales en cultivo transfectadas con GFP, un RNA de interferencia del receptor P2X7 (shRNA-P2X7) fusionado a GFP (P2X7-GFP). Escala (50 μm).

nución en la actividad de la quinasa GSK3. Esta disminución de la actividad de GSK3 no solo correlaciona con la elongación y arborización axonal inducidas por la inhibición del receptor P2X7, sino que ambos fenómenos comparten una secuencia temporal. Así, sabemos que la inhibición del receptor P2X7 desencadena una activación de la quinasa FAK. Dado que un sustrato de FAK es la PI3-

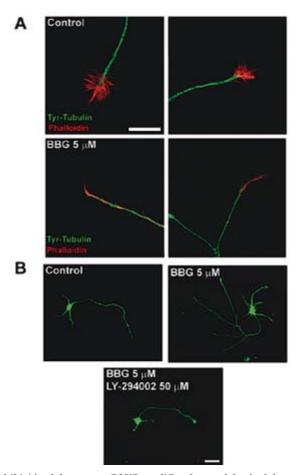


Figura 7. La inhibición del receptor P2X7 modifica la morfología del cono de crecimiento de las neuronas de hipocampo mediante la inhibición de la P13- quinasa. A, Se muestran la morfología de los conos de crecimiento de las neuronas de hipocampo tratadas durante 3 días en presencia o ausenta del antagonista del receptor purinérgico P2X7 BBG (5μΜ). Mientras los conos de las neuronas control mostraron una morfología mixta de lamedipodio y filopodio, los conos tratados con BBG solo presentan una morfología de lamedipodio. Escala (10 μm). B, Se muestran neuronas de hipocampo en su tercer día de cultivo tratadas en presencia y ausencia de BBG (5 μΜ) y/ó del inhibidor de P13-quinasa LY-294002 (50 μΜ). El BBG y el inhibidor de la IP3-quinasa fueron añadidos después del primer día de cultivo. Escala (50 μm).

quinasa (90), la activación de FAK desencadenaría una activación de la PI3-quinasa. Esta secuencia de acontecimientos la pudimos constatar en nuestro modelo de neuronas de hipocampo, al observar como la arborización y elongación axonal inducida por el BBG eran revertidas en presencia de un inhibidor de la PI3-quinasa (LY-294002) (Figura 7). Como se ha mencionado con anterioridad,

la activación de PI3-quinasa desencadena la fosforilación e inhibición de GSK3, de tal manera que el receptor P2X7 desencadena finalmente una regulación de la actividad de la quinasa GSK3.

El hecho de que la inhibición de GSK3 promueve el crecimiento y arborización axonal en axones lesionados *in vivo* (91), abre nuevas perspectiva terapéuticas para la utilización de inhibidores del receptor P2X7 en lesiones medulares.

4. MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES QUE REGULAN LA LOCALIZACIÓN POLARIZADA DE PROTEÍNAS AXONALES

Aunque este apartado merecería por sí solo un capítulo propio, a continuación comentamos algunas ideas sobre la forma en que el axón distribuye sus proteínas. Simultáneamente a la estructuración morfológica del axón, en la membrana axonal se van localizando proteínas (canales iónicos, receptores o proteínas de adhesión) que guían el axón, regulan su crecimiento y permiten la generación de potenciales de acción. Como se ha indicado con anterioridad, esta localización polarizada de diferentes proteínas en el axón, depende del citoesqueleto de actina y microtúbulos, así como de las proteínas de transporte (kinesinas, dineinas o miosinas). En los últimos 10 años el estudio de las secuencias aminoácidicas de proteínas axonales ha permitido demostrar que existen diversos motivos de aminoácidos capaces de localizar proteínas específicamente en el axón. Se ha propuesto que algunas de estas proteínas pueden ser transportadas directamente hacia el axón, como es el caso de NgCAM. Sin embargo, la distribución específicamente axonal de muchas de las proteínas estudiadas depende de su eliminación, mediante endocitosis, de la membrana somatodendrítica (92). Este es el caso del canal de sodio neuronal dependiente de voltaje (92) o de la proteína VAMP-2 (93). Una vez transportadas hacia el axón, estas proteínas deben anclarse en un dominio específico para cumplir su función. Si bien en el dominio somatodendrítico, las proteínas con dominios PDZ, tales como la PSD-95, cumplen la función de anclaje de proteínas funcionales de membrana; en el caso del axón y del segmento inicial del axón, esta función está representada por la ankirina B y ankirina G. Proteínas que actúan como adaptadores entre las proteínas de membrana y el citoesqueleto de actina y microtúbulos. La proteína de adhesión L1 contiene una secuencia de aminoácidos (FIGQY) que la permite unirse a las ankirinas y estabilizarse en la membrana axonal. Dicho anclaje está regulado por mecanismos de fosforilación y una secuencia de aminoácidos (RSLE) que permite su endocitosis (94, 95). Otro ejemplo son los canales de sodio y potasio dependientes de voltaje, Na.1.2, Na.1.6 o KCNQ2/3, que se unen a la ankirina G a través del motivo

AIS descrito en los canales de sodio (47). Recientemente, se ha descrito que una proteína de densidades postsinápticas, PSD-93, es capaz de anclar canales de potasio y localizarlos en el axón (96). Durante los últimos 10 años se han descrito motivos aminoacídicos que regulan la localización y anclaje de proteínas en el axón, lo que ha permitido entender las bases estructurales que permiten desarrollar la función del axón en la transmisión de señales.

5. CONCLUSIÓN

La complejidad funcional del sistema nervioso tiene como unidad básica funcional a la neurona, junto con otras células que le sirven de apoyo y con las que intercambia información. A pesar de que ya hace alrededor de un siglo que Santiago Ramón y Cajal propuso la teoría neuronal, solamente durante los últimos 25 años hemos sido capaces de obtener bastante, pero aún no suficiente, información sobre cómo se forma una neurona y que mecanismos intracelulares permiten crear la arquitectura morfológica y funcional de las neuronas. Sabemos cómo se inicia un axón, cómo se forma el citoesqueleto neuronal y cuáles son las causas de algunas enfermedades neurodegenerativas. Para su tratamiento, así como el tratamiento de lesiones axonales, debemos conocer los factores, receptores y vías de señalización que regulan el crecimiento axonal, así como los mecanismos que regulan su posición y que son responsables de que un receptor cumpla su función en un momento concreto y en una localización específica de la neurona. De esta forma, podremos encontrar dianas farmacológicas adaptadas que permitan regular vías de señalización en dominios específicos de las neuronas. Por último, un mayor conocimiento de los mecanismos que regulan el crecimiento axonal también será útil en un futuro para intentar regenerar axones lesionados, junto con otras estrategias centradas en las células de glía.

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a los jóvenes científicos que han colaborado en el desarrollo del trabajo sobre la función de los receptores purinérgicos en la elongación y arborización axonal; Ana Del Puerto Del Pino, Juan I. Díaz Hernández y María Diez Zaera. Su trabajo será publicado en breve en Journal Cell Science. Este proyecto ha sido financiado por el plan Nacional I+D mediante los proyectos SAF2006-00906 (JJG) y BFU2005-02079 (MDH). También queremos agradecer la ayuda recibida por parte de la Fundación Marcelino Botín y

el entusiasmo y apoyo de la profesora María Teresa Miras Portugal. Por último quisiéramos agradecer el apoyo e intercambio de ideas por parte de los doctores Francisco Wandosell y José J. Lucas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ramón y Cajal, S. (1891) Comunicación acerca de la significación fisiológica de las expansiones protoplásmicas y nerviosas de la sustancia gris. En: Primer Congreso Médico-Farmaceútico regional. Valencia, 1891. *Revista de Ciencias Médicas de Barcelona*. 17: 671-679, 715-723.
- (2) Ramón y Cajal, S. (1897) Leyes de la morfología y el dinamismo de las células nerviosas. *Revista Trimestral Micrográfica*. 2: 1-28.
- (3) DOTTI, C. G.; SULLIVAN, C. A. AND BANKER, G. A. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8: 1454-68.
- (4) Goslin, K. and Banker, G. (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell. Biol.* 108: 1507-16.
- (5) KAECH, S. AND BANKER, G. (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* 1: 2406-15.
- (6) DA SILVA, J. S.; MEDINA, M.; ZULIANI, C.; DI NARDO, A., WITKE, W. AND DOTTI, C. G. (2003) RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell. Biol.* 162: 1267-79.
- (7) Arber, S.; Barbayannis, F. A.; Hanser, H.; Schneider, C.; Stanyon, C. A.; Bernard, O. and Caroni, P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*. 393: 805-9.
- (8) Higgs, H. N. and Pollard, T. D. (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 649-76.
- (9) DA SILVA, J. S. AND DOTTI, C. G. (2002) Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 694-704.
- (10) VAN AELST, L. AND D'SOUZA-SCHOREY, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. Genes Dev. 11: 2295-322.
- (11) WITTMANN, T. AND WATERMAN-STORER, C. M. (2001) Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J. Cell. Sci.* 114: 3795-803.
- (12) DE ANDA, F. C.; POLLAROLO, G.; DA SILVA, J. S.; CAMOLETTO, P. G.; FEIGUIN, F. AND DOTTI, C. G. (2005) Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature*. 436: 704-8.

- (13) CALDERON DE ANDA, F.; GARTNER, A.; TSAI, L. H. AND DOTTI, C. G. (2008) Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J. Cell. Sci.* 121: 178-85.
- (14) SHI, S. H.; JAN, L. Y. AND JAN, Y. N. (2003) Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*. 112: 63-75.
- (15) SCHWAMBORN, J. C. AND PUSCHEL, A. W. (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* 7: 923-9.
- (16) Bradke, F. and Dotti, C. G. (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science*. 283: 1931-4.
- (17) GARRIDO, J. J.; SIMON, D.; VAREA, O. AND WANDOSELL, F. (2007) GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett.* 581: 1579-86.
- (18) Kim, W. Y.; Zhou, F. Q.; Zhou, J.; Yokota, Y.; Wang, Y. M.; Yoshimura, T.; Kalbuchi, K.; Woodgett, J. R.; Anton, E. S. and Snider, W. D. (2006) Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron.* 52: 981-96.
- (19) Zhou, F. Q.; Zhou, J.; Dedhar, S.; Wu, Y. H. and Snider, W. D. (2004) NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron.* 42: 897-912.
- (20) Gartner, A.; Huang, X. and Hall, A. (2006) Neuronal polarity is regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3beta) independently of Akt/PKB serine phosphorylation. *J. Cell. Sci.* 119: 3927-34.
- (21) JIANG, H.; GUO, W.; LIANG, X. AND RAO, Y. (2005) Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell.* 120: 123-35.
- (22) Gonzalez-Billault, C.; Avila, J. and Caceres, A. (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol. Biol. Cell.* 12: 2087-98.
- (23) Gonzalez-Billault, C.; Engelke, M.; Jimenez-Mateos, E. M.; Wandosell, F.; Caceres, A. and Avila, J. (2002a) Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J. Neurosci. Res.* 67: 713-9.
- (24) Gonzalez-Billault, C.; Owen, R.; Gordon-Weeks, P. R. and Avila, J. (2002b) Microtubule-associated protein 1B is involved in the initial stages of axonogenesis in peripheral nervous system cultured neurons. *Brain Res.* 943: 56-67.
- (25) ULLOA, L.; DIEZ-GUERRA, F. J.; AVILA, J. AND DIAZ-NIDO, J. (1994) Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. 61: 211-23.

- (26) COLE, A. R.; KNEBEL, A.; MORRICE, N. A.; ROBERTSON, L. A.; IRVING, A. J., CONNOLLY, C. N. AND SUTHERLAND, C. (2004) GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons. *J. Biol. Chem.* 279: 50176-80.
- (27 FUKATA, Y.; ITOH, T. J.; KIMURA, T.; MENAGER, C.; NISHIMURA, T.; SHIROMIZU, T.; WATANABE, H.; INAGAKI, N.; IWAMATSU, A.; HOTANI, H. ET AL. (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* 4: 583-91.
- (28) INAGAKI, N.; CHIHARA, K.; ARIMURA, N.; MENAGER, C.; KAWANO, Y.; MATSUO, N.; NISHIMURA, T.; AMANO, M. AND KAIBUCHI, K. (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* 4: 781-2.
- (29) JOPE, R. S. AND JOHNSON, G. V. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29: 95-102.
- (30) VOTIN, V.; NELSON, W. J. AND BARTH, A. I. (2005) Neurite outgrowth involves adenomatous polyposis coli protein and beta-catenin. *J. Cell. Sci.* 118: 5699-708.
- (31) Sosa, L.; Dupraz, S.; Laurino, L.; Bollati, F.; Bisbal, M.; Caceres, A.; Pfenninger, K. H. and Quiroga, S. (2006) IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* 9: 993-5.
- (32) SANCHEZ-PONCE, D.; TAPIA, M.; MUNOZ, A. AND GARRIDO, J. J. (2008) New role of IKK alpha/beta phosphorylated IkappaB alpha in axon outgrowth and axon initial segment development. *Mol. Cell. Neurosci.* 37: 832-44.
- (33 HOEFLICH, K. P.; Luo, J.; Rubie, E. A.; Tsao, M. S.; Jin, O. and Woodgett, J. R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*. 406: 86-90.
- (34) Shelly, M.; Cancedda, L.; Heilshorn, S.; Sumbre, G. and Poo, M. M. (2007) LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell.* 129: 565-77.
- (35) OLIVA, A. A., JR., ATKINS, C. M., COPENAGLE, L. AND BANKER, G. A. (2006) Activated c-Jun N-terminal kinase is required for axon formation. *J. Neurosci.* 26: 9462-70.
- (36) Lein, P. J.; Guo, X.; Shi, G. X.; Moholt-Siebert, M.; Bruun, D. and Andres, D. A. (2007) The novel GTPase Rit differentially regulates axonal and dendritic growth. *J. Neurosci.* 27: 4725-36.
- (37) JACOBSON, C.; SCHNAPP, B. AND BANKER, G. A. (2006) A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron.* 49: 797-804.
- (38 NAKATA, T. AND HIROKAWA, N. (2003) Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J. Cell. Biol.* 162: 1045-55.

- (39 PALAY, S. L.; SOTELO, C.; PETERS, A. AND ORKAND, P. M. (1968) The axon hillock and the initial segment. *J. Cell. Biol.* 38: 193-201.
- (40) STUART, G.; SPRUSTON, N.; SAKMANN, B. AND HAUSSER, M. (1997) Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci*. 20: 125-31.
- (41) Winckler, B.; Forscher, P. and Mellman, I. (1999) A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature*. 397: 698-701.
- (42) Garrido, J. J.; Giraud, P.; Carlier, E.; Fernandes, F.; Moussif, A.; Fache, M. P.; Debanne, D. and Dargent, B. (2003) A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science*. 300: 2091-4.
- (43) Kole, M. H.; Ilschner, S. U.; Kampa, B. M.; Williams, S. R.; Ruben, P. C. and Stuart, G. J. (2008) Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat. Neurosci.* 11: 178-86.
- (44) NAKADA, C.; RITCHIE, K.; OBA, Y.; NAKAMURA, M.; HOTTA, Y.; IINO, R.; KASAI, R. S.; YAMAGUCHI, K.; FUJIWARA, T. AND KUSUMI, A. (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat. Cell. Biol.* 5: 626-32.
- (45) Komada, M. and Soriano, P. (2002) [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J. Cell. Biol.* 156: 337-48.
- (46) Lemaillet, G.; Walker, B. and Lambert, S. (2003) Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J. Biol. Chem.* 278: 27333-9.
- (47) PAN, Z.; KAO, T.; HORVATH, Z.; LEMOS, J.; SUL, J. Y.; CRANSTOUN, S. D.; BENNETT, V.; SCHERER, S. S. AND COOPER, E. C. (2006) A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J. Neurosci.* 26: 2599-613.
- (48) FACHE, M. P.; MOUSSIF, A.; FERNANDES, F.; GIRAUD, P.; GARRIDO, J. J. AND DARGENT, B. (2004) Endocytotic elimination and domain-selective tethering constitute a potential mechanism of protein segregation at the axonal initial segment. *J. Cell. Biol.* 166: 571-8.
- (49) Mohler, P. J.; Rivolta, I.; Napolitano, C.; LeMaillet, G.; Lambert, S.; Priori, S. G. and Bennett, V. (2004) Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 17533-8.
- (50) Shea, T. B. (1999) Selective stabilization of microtubules within the proximal region of developing axonal neurites. *Brain Res. Bull.* 48: 255-61.

- (51) Dunn, S.; Morrison, E. E.; Liverpool, T. B.; Molina-Paris, C.; Cross, R. A.; Alonso, M. C. and Peckham, M. (2008) Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell. Sci.* 121: 1085-95.
- (52) SCHULTZ, C.; KONIG, H. G.; DEL TURCO, D.; POLITI, C.; ECKERT, G. P.; GHEBREMED-HIN, E.; PREHN, J. H.; KOGEL, D. AND DELLER, T. (2006) Coincident enrichment of phosphorylated IkappaBalpha, activated IKK, and phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 33: 68-80.
- (53) Kalil, K.; Szebenyi, G. and Dent, E.W. (2000) Common mechanisms underlying growth cone guidance and axon branching. *J. Neurobiol.* 44:145-58.
- (54) DENT, E.W.; TANG, F. AND KALIL, K. (2003) Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist*. 5: 343-53.
- (55) BAGNARD, D.; LOHRUM, M.; UZIEL, D.; PÜSCHEL, A.W. AND BOLZ, J. (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development*. 125: 5043-53.
- (56) POLLEUX, F.; GIGER, R.J.; GINTY, D.D.; KOLODKIN, A.L. AND GHOSH, A. (1998) Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science*. 282: 1904-6.
- (57) CAMPBELL, D.S.; REGAN, A.G.; LOPEZ, J.S.; TANNAHILL, D.; HARRIS, W.A. AND HOLT, C.E. (2001) Semaphorin 3A elicits stage-dependent collapse, turning, and branching in *Xenopus* retinal growth cones. *J. Neurosci.* 21: 8538-47.
- (58) Zhou, Y.; Gunput, R.A. and Pasterkamp, R.J. (2008) Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.* 33: 161-70.
- (59) Hubel, D.H.; Wiesel, T.N. and LeVay, S. (1977) Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 278: 377-409.
- (60) Antonini, A. and Stryker, M.P. (1993) Rapid remodeling of axonal arbors in the visual cortex. *Science*. 260:1819-21.
- (61) Yu, W.; Qiang, L.; Solowska, J.M.; Karabay, A.; Korulu, S. and Baas, P.W. (2008) The Microtubule severing Proteins Spastin and Katanin Participate Differently in the Formation of Axonal Branches. *Mol. Biol. Cell.* 19: 1485-98.
- (62) HUTCHINS, B.I. AND KALIL, K. (2008) Differential outgrowth of axons and theirs branches is regulates by localized calcium transients. *J. Neuroscience*. 28: 143-153.
- (63) Ohnami, S.; Endo, M.; Hirai, S.; Uesaka, N.; Hatanaka, Y.; Yamashita, T. and Yamamoto, N. (2008) Role of RhoA in activity-dependent cortical axon branching. *J. Neurosci.* 28: 9117-21.

- (64) RICO, B.; BEGGS, H.E.; SCHAHIN-REED, D.; KIMES, N.; SCHMIDT, A. AND REICHARDT, L.F. (2004) Control of axonal branching and synapse formation by focal adhesion kinase. *Nat. Neurosci.* 7: 1059-69.
- (65) RALEVIC, V. AND BURNSTOCK, G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- (66) RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, C.; HERMAN, M.A.; REED, J.K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P. AND CACIAGLI, F. (1999) Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.* 59: 663-90.
- (67) Burnstock, G. (2008) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87: 659-797.
- (68) EDWARDS, F.A.; GIBB, A.J. AND COLQUHOUN, D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*. 359: 144-147.
- (69) Evans, R.J.; Derkach, V. and Surprenant, A. (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*. 357: 503-5.
- (70) TORRES, G.E.; EGAN, T.M. AND VOIGT, M.M. (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* 274: 6653-9.
- (71) Khakh, B.S. (2001) Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 165-74.
- (72) Rodrigues, R.J.; Almeida, T.; Richardson, P.J.; Oliveira. C.R. and Cunha, R.A. (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 25: 6286-95.
- (73) Díaz-Hernández, M.; Pintor, J.; Castro, E. and Miras-Portugal, M.T. (2002) Co-localizations of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology*. 42: 20-33.
- (74) PANKRATOV, Y.V.; LALO, U.V. AND KRISHTAL, O.A. (2002) Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J. Neurosci.* 22: 8363-9.
- (75) Heine, C.; Heimrich, B.; Vogt, J.; Wegner, A.; Illes, P. and Franke, H. (2006) P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro. *Neuroscience*. 138: 303-11.
- (76) Cheung, K. K.; Chanb, A.W.Y. and Burnstock, G. (2005) Expression of p2x purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor aA-xon outgrowth in neural tube explant cultures. *Neuroscience*. 133: 937-945.
- (77) ZIMMERMANN, H. (2006) Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers. Arch.* 452: 573-88.

- (78) Shukla, V.; Zimmermann, H.; Wang, L.; Kettenmann, H.; Raab, S.; Hammer, K.; Sévigny, J.; Robson, S.C. and Braun, N. (2005) Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 80: 600-10.
- (79) ROUX, R.; Wu, J.; HENAFF, E.; TORRES, J. AND GREZ, C. (2008) Regions of growth are regions release of ATP and highest expression of ectonucleotidases AtAPY1 and AtAPY2 in *Arabidopsis*. *Purinergic Signalling*. 4: S112.
- (80) Gomez, T.M. AND Spitzer, N.C. (1999) In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients. *Nature*. 397: 350-355.
- (81) TANG, F.; DENT, E.W. AND KALIL, K. (2003) Spontaneuos calcium transients in developing cortical neurons regulate axonal outgrowth. *J. Neurosci.* 23: 927-936.
- (82) Díaz-Hernández, M.; Pintor, J.; Castro, E. and Miras-Portugal, M.T. (2001a) Independent receptors for diadenosine polyphosphates and ATP in rat midbrain single synaptic terminals. *Eur. J. Neurosci.* 14: 918-928.
- (83) Díaz-Hernández, M.; Gómez-Villafuertes, R.; Hernando, F.; Pintor, J. and Miras-Portugal, M.T. (2001b) Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X₃ subunits. *Neuroscience*. *Lett.* 301: 159-162.
- (84) GIRÁLDEZ, L.; DIAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; PINTOR, J.; CASTRO, E. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2001) ATP and diadenosine polyphosphate receptors in rat basal ganglia aminergic terminals. *J. Neurosci. Res.* 64: 174-182.
- (85) Gualix, J.; Gómez-Villafuertes, R.; Díaz-Hernández, M. and Miras-Portugal, M.T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. J. Neurochem. 87: 160-171.
- (86) Miras-Portugal, M.T.; Díaz-Hernández, M.; Giráldez, L.; Hervás, C.; Gómez-Villafuertes, R.; Sen, R.P.; Gualix, J. and Pintor, J. (2003) P2X7 receptors in rat brain. Presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem. Res.* 28: 1597-1605.
- (87) FAN, R.S.; JACAMO, R.O.; JIANG, X.; SINNETT-SMITH, J. AND ROZENGURT, E. (2005) G protein-couple receptor activation rapidly stimulates focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-843. Mediation by Calcium, calmodulin, and calcium/calmodulin dependent Kinase II. *J. Biol. Chem.* 280: 24212-20.
- (88) Díaz-Hernández, M.; Sánchez-Nogueiro, J.; Pintor, J. and Miras-Portugal, M.T. (2004) Interaction between dinucleotide and epibatidine sensitive-nicotinic receptors in individual cholinergic terminals from rat midbrain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311: 954-967.
- (89) León, D.; Hervás, C. and Miras-Portugal, M.T. (2006) P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulindependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. Eur. J. Neurosci. 23: 2999-3013.

- (90) XIA, H.; NHO, R.S.; KAHM, J.; KLEIDON, J. AND HENKE, C.A. (2004) Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen mmatrices via beta 1 integrin viability signalling phatway. *J. Biol. Chem.* 279: 33024-34.
- (91) DILL, J.; WANG, H.; ZHOU, F. AND LI, S. (2008) Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS. *J. Neurosci.* 28: 8914-28.
- (92) Garrido, J.J.; Fernandes, F.; Giraud, P.; Mouret, I.; Pasqualini, E.; Fache, M.P.; Jullien, F. and Dargent, B. (2001) Identification of an axonal determinant in the C-terminus of the sodium channel Na(v)1.2. *EMBO J.* 20: 5950-61.
- (93) SAMPO, B.; KAECH, S.; KUNZ, S. AND BANKER, G. (2003) Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron*. 37: 611-24.
- (94) Kamiguchi, H. and Lemmon, V. (1998) A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J. Neurosci.* 18: 3749-56.
- (95) Zhang, X.; Davis, J.Q.; Carpenter, S. and Bennett, V. (1998) Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin. *J. Biol. Chem.* 273: 30785-94.
- (96) OGAWA, Y.; HORRESH, I.; TRIMMER, J.S.; BREDT, D.S.; PELES, E. AND RASBAND, M.N. (2008) Postsynaptic density-93 clusters Kv1 channels at axon initial segments independently of Caspr2. *J. Neurosci.* 28: 5731-9.

2. Los canales de comunicación sensorial TRPs como dianas farmacológicas

ANTONIO FERRER MONTIEL

RESUMEN

Los canales TRP (Receptores de Potencial Transitorio) constituyen una extensa familia subdividida en 8 subfamilias, a saber, TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML, la familia TRPN presente en invertebrados, y la distante TRPY expresada en levaduras. Estos receptores juegan un papel fundamental en la transducción de las distintas modalidades somatosensoriales en mamíferos, incluyendo la termosensación, la recepción de feromonas, la regulación del tono vascular, la nocicepción y el dolor. Cada vez es más claro que los canales TRP son cardinales en la fisiología sensorial y que su alteración funcional, bien mediante mutaciones o por estímulos nocivos o factores pro-inflamatorios, conduce a estados patológicos en humanos. Por tanto, los canales TRP han sido validados como dianas terapéuticas para intervención farmacológica. El desarrollo de compuestos que reviertan o controlen su actividad patológica es, por tanto, un objetivo fundamental de la neurofarmacología.

Palabras clave: Canales iónicos. Nocicepción. Neurobiología sensorial. Sinpatogénesis. Termosensación.

ABSTRACT

TRP channels of sensory communication as pharmacological targets

TRP channels (Transient Receptor Potential) encompass a large family which is subclassified in 8 distinct subfamilies, namely TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML, the TRPN subfamily found in invertebrates and the dis-

tant TRPY subfamily present in yeast. These receptors play a pivotal role in the transduction of the different somatosensory modalities in mammals, including thermosensation, pheromone reception, regulation of the vascular tone, nociception and pain. Cumulative evidence is substantiating the tenet that these channels are central in sensorial physiology and that their dysfunction, either because of mutation or by their interaction with noxious stimuli and pro-inflammatory agents, results in human pathologies. Thus, these TRP channels are being validated as therapeutic targets for drug intervention. The development of compounds that reverse or abrogate their pathological activity is, therefore, a central goal of current neuropharmacology.

Keywords: Ion channels. Nociception. Sensory neurobiology. Synaptogenesis. Thermosensation.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de explorar el entorno mediante los sentidos supone una clara ventaja evolutiva que permite una adaptación idónea salvaguardando la integridad del organismo. Esta habilidad es el resultado de un sistema nervioso altamente especializado, capaz de reconocer, integrar, interpretar y responder a las distintas modalidades sensoriales. El sistema nervioso periférico (SNP) esta constituido por fibras nerviosas que transducen la información sensorial en actividad eléctrica que es transmitida desde las terminales periféricas al cerebro. La comunicación desde la periferia al cerebro es realizada por fibras nerviosas que reciben el nombre de aferentes, mientras que la respuesta desde el sistema nervioso central al periférico es conducida por fibras eferentes (1). Las fibras aferentes constituidas por neuronas de conducción rápida, altamente mielinizadas, se ocupan, principalmente, de transducir fenómenos proprioceptivos y mecánicos; mientras que, las fibras formadas por neuronas de conducción media y lenta son responsables de interpretar y responder a estímulos potencialmente nocivos actuando, por tanto, como nociceptores (1). Las neuronas nociceptivas reconocen estímulos mecánicos, térmicos y químicos que pueden ser dañinos para el organismo. Por ello, los nociceptores son considerados como guardianes de la integridad tisular y la nocicepción como un mecanismo de seguridad esencial para la vida.

A nivel molecular, los nociceptores poseen en sus terminales un conjunto de receptores proteicos preparados para reconocer y transducir los estímulos nocivos de tipo físico (mecánicos, osmóticos, y térmicos) y químicos. En este sentido, disponemos de los receptores capaces de reconocer el espectro de temperaturas desde muy frías ($\leq 17^{\circ}$ C) a muy calientes ($\geq 50^{\circ}$ C) (1-7). Una propiedad

similar es esperable en los mecanoreceptores, aunque su identidad molecular es todavía ignota. No obstante, a pesar de esta propiedad esencial de los termoreceptores y, probablemente de los mecanoreceptores, es importante señalar que la transducción nociceptiva por parte de los nociceptores es el balance de la activación e inhibición de más de un receptor y/o canal proteico presente en su membrana (1). Por ello, intentar reducir la especificidad nociceptora a la presencia de un determinado sensor molecular es, cuando menos, una simplificación excesiva de la transducción somatosensorial (1).

LA FAMILIA DE LOS CANALES TRP

La neurobiología sensorial ha sufrido un notable avance desde el reconocimiento que la familia de receptores TRP (por Transient Receptor Potential;), originalmente descubierta en Drosophila melanogaster (2), juega un papel fundamental en la transducción de las distintas modalidades somatosensoriales en mamíferos, incluyendo la termosensación, la recepción de feromonas, la regulación del tono vascular, nocicepción y el dolor. Los canales TRP se expresan en una gran variedad de organismos multicelulares que comprende las levaduras, los gusanos, la mosca de la fruta, el pez cebra, y los mamíferos. Sorprendentemente, todavía no se han descrito ortólogos en los procariotas. Desde su descubrimiento, la familia de receptores TRP ha ido creciendo estando en la actualidad formada por 28 miembros agrupados en 7 subfamilias (TRPC1-7, TRPM1-8, TRPV1-6, TRPA1, TRPP1-3, y TRPML1-3) y, la subfamilia TRPN presente únicamente en invertebrados (Figura 1) (2). Existe un familia adicional (TRPY) evolutivamente más distanciada de las anteriores y que se expresa en levaduras (2). La diversidad de la familia es incrementada por el descubrimiento de nuevas isoformas que aparecen por procesamiento posttranscripcional (2). Estas variantes normalmente poseen una función moduladora de la actividad de las proteínas silvestres.

Todos los receptores TRP son canales catiónicos que permiten el flujo de Ca²⁺ y Na⁺, aunque según la isoforma, la permeabilidad y la selectividad para cationes mono o divalentes varía sustancialmente de 100:1 a 0.05:1. Su patrón de distribución tisular es muy amplio, apareciendo expresado en prácticamente todos los tejidos, especialmente en los sistemas nerviosos central y periférico, en los que juegan un papel crucial en la transducción sensorial convirtiendo los estímulos ambientales en cambios de excitabilidad de la membrana neuronal (2). Además, su permeabilidad al catión Ca²⁺ implica la activación de señales de transducción celular que también contribuyen a la transmisión sensorial. Estudios de asociación genética han relacionado mutaciones en estos receptores con

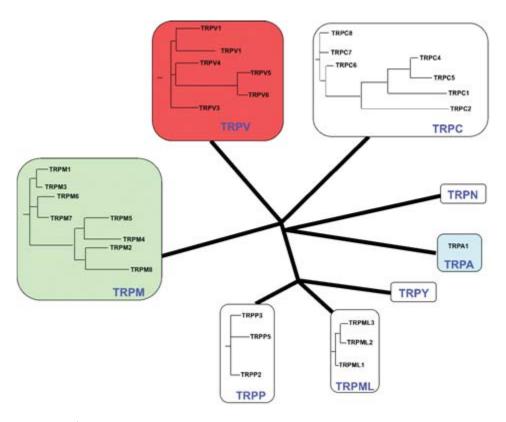


FIGURA 1. Árbol filogenético de la familia de receptores TRP. Se muestran las subfamilias de los canales TRP, con cada uno de los miembros identificados en mamíferos. De las familias TRPN y TRPY no existen todavía miembros en mamíferos. Modificada de la referencia (20).

enfermedades humanas (Tabla I). Así, mutaciones en la familia TRPP produce la enfermedad autosómica dominante conocida como policistitis renal, la mutación de TRPML conduce a la mucolipidosis tipo IV, la alteración de TRPC6 produce glomeruloesclerosis segmental, una condicion autosómica dominante, y la mutación de TRPM6 causa hipomagnesemia e hipocalcemia (2, 4).

Estructuralmente, los canales TRP son homo o hetoroligómeros formados por la asociación de cuatro subunidades alrededor de un eje de simetría central que coincide con el poro iónico. Cada subunidad está formada por 6 segmentos transmembrana (S1-S6), un lazo hidrofílico entre el quinto y sexto segmento transmembrana que estructura el poro iónico y dos dominios intracelulares en los extremos N- y C-terminales (2) (Figura 2). La región N-terminal puede contener dominios de unión a anquirinas que juegan un papel clave en la interac-

ción de estos receptores con proteínas citosólicas construyendo complejos proteicos esenciales para su función (2, 8, 9). El dominio C-terminal contiene una región importante para la asociación de las subunidades y zonas de interacción con fosfoinosítidos y proteínas reguladoras (2, 8). Algunos miembros de la familia TRPM tienen la singularidad de contener actividad enzimática en su extremo C-terminal por lo que reciben el nombre de canalzimas (2).

Tabla I. Enfermedades asociadas a canales TRPs

Canal	Enfermedad	Síntomas
TRPC3	Degeneración retiniana	Muerte fotoreceptores
TRPC6	Glomeruloesclerosis focal y segmental	Pérdida renal
TRPM2	Estrés oxidativo y neurodegeneración	Neurodegeneración
TRPM6	Hipomagnesemia con hipocalcemia	Pérdida renal secundaria
TRPM7	Estrés oxidativo y neurodegeneración	Neurodegeneración
TRPP2/TRPP1	Policistitis renal autosómica dominante	Fallo renal, quistes renales
TRPML1	Mucolipidosis tipo IV	Retraso mental, neurodegeneración, degeneración retiniana
TRPV1	Dolor inflamatorio y neuropático	Inflamación y dolor

Información tomada de referencias (2) y (4).

LAS SUBFAMILIAS TRPV, TRPM Y TRPA EN TERMOSENSACIÓN

Dentro de la familia de los canales TRP destacan las subfamilias de TRPV, TRPM y TRPA1 por ser receptores ionotrópicos que responden a estímulos térmicos que comprenden desde temperaturas nocivas frías a calientes (Tabla II). El primer grupo (TRPV) contiene los llamados termo-TRPs que se activan por calor, transformando la energía térmica en excitabilidad neuronal. La familia TRPV en mamíferos esta formada por 6 miembros divididos en 2 grupos según el grado de homología, a saber, TRPV1-4 y TRPV5-6. Los receptores que reconocen estímulos térmicos son TRPV1-4, y entre ellos destaca el receptor TRPV1 por ser un sensor molecular del umbral de temperaturas nocivas para el organismo (10). Aunque ya se sospechaba de su existencia desde hacía mucho tiempo debido a la observación de que las neuronas sensoriales eran excitadas por la capsaicina, un vanilloide presente en los chiles, su clonación no se produjo hasta el año 1997 por el grupo del Prof. David Julius de la Universidad de

California en San Francisco (10). Utilizando una estrategia de expresión-clonación en células HEK293 este equipo identificó la proteína de membrana que respondía a la capsaicina incrementando el flujo de iones Ca²+ al interior celular. La racionalidad de utilizar la capsaicina como ligando específico del receptor TRPV1 (originalmente llamado VR1) fue la sensación de quemadura que se siente tanto al ingerir una comida picante como con la aplicación tópica del vanilloide (3, 6, 7, 10). Por tanto, no resultó sorprendente que el receptor clonado también era activable por calor de intensidad quemante, concretamente con temperaturas que sobrepasan los 42ºC, convirtiéndolo en una especie de termómetro molecular. Además, este receptor es activado por pH ácido extracelular y, recientemente se ha descrito su respuesta a alicina, componente activo del ajo (2, 3, 6, 7). Por tanto, el canal TRPV1 es un receptor polimodal que transduce estímulos físicos y químicos. La clonación de TRPV1 fue un hito que impulsó notablemente el avance de la neurobiología sensorial.

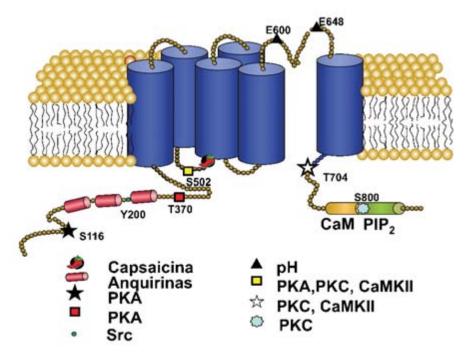


FIGURA 2. Topología molecular de una subunidad del receptor TRPVI. En azul se ilustran los segmentos transmembrana. Se indican los diversos sitios de modulación identificados por diferentes rutas de señalización intracelular. La asociación de cuatro de estas subunidades alrededor de un eje de simetría central produciría un receptor funcional. Entre la T704 y el sexto segmento transmembrana se localiza el dominio de asociación TRP.

Tabla II. Canales TRP activados por temperatura

Canal	Сготоѕота	Umbral térmico	Sensibilidad Mecánica	Selectividad P_{Ca}^{2+}/P_{Na}^{\pm}	Ratón nulo	Agonistas	Antagonistas	Moduladores	Expresión Tisular
TRPV1	17p13.3	>42°C	Hiperosmo	3.8	Reducida	Capsaicina, pH,	Rojo rutenio,	Voltaje,	DRG, TG, neuronas,
			-laridad	(calor)	hiperalgesia	resiniferatoxina,	capsacepina, BCTC,	fosforilación,	vejiga, queratinocitos,
				9.6	térmica,	alicina, alcanfor,	DD01050, yodo-	exocitosis, PIP ₂ ,	mastocitos, células
				(vanilloides)	química y	eugeneol,	resiniferatoxina,	citoquinas,	dendríticas, testículos,
					mecánica.	anandamida, 2-APB,	SB-452533, SDZ-	bradiquinia,	próstata, adipocitos,
					Alterada	hidroxi-α-sanshool,	249482, nuvanil,	triptasa, histamina,	folículos pilosos,
					nocicepción	clortrimazol,	SB-705498,	NGF.	
					térmica.	piperina, etanol,	AMG-517, NGD-		
						nicotina.	8243		
TRPV2	17p11.2	>53°C	Hipoosmo-	3.0	I	2-APB, D9-THC,	Rojo rutenio,	Exocitosis	DRG, medula
			laridad			probenecid	SKF96365		espinal, cerebro,
									bazo, intestino.
TRPV3	17p13.3	30-39ºC	I	2.6	Alterada	Alcanfor, carvacrol,	Rojo rutenio,	Ácidos grasos	DRG, TG, cerebro,
					percepción	eugenol, timol,	difeniltetrahi-	poliinsaturados	medula espinal,
					térmica	carveol,	drofurano		lengua,
						dihidrocarveol, ácido			queratinocitos.
						araquidónico, 6-tert-			
						butil-m-cresol			

Tabla II. Canales TRP activados por temperatura. (Continuación)

Canal									
	Cromosoma	Umbral térmico	Sensibilidad Mecánica	Selectividad P_{Ca}^{2+}/P_{Na}^{\pm}	Ratón nulo	Agonistas	Antagonistas	Moduladores	Expresión Tisular
TRPV4	12q24.1	25-35 ^o C	Mecánico, hipoosmo- laridad	9	Alterada hiperalgesia térmica, mecánica y osmótica	40PPD, anandamida, bisandrografolide A, ácido epoxicicosatrienoico.	Rojo rutenio	Exocitosis	DRG, riñón, bazo, pulmón, testículos, corazón, hígado, endotelio, queratinocitos.
TRPM5	11p15.5	15-35°C	I	0.2	I	I	I	Voltaje, PIP ₂ Ca ²⁺	Intestino, hígado, pulmón, células gustativas.
TRPM8	2q37.2	23-28°C	Tensión membranal	3.3	Alterada percepción al frío.	Mentol, icilina, eucalipto, WS23, LPC	BCTC, SKF96365, clotrimazol, DD01050, 2-APB	Voltaje, pH, PIP ₂	DRG, TG, próstata, hígado.
TRPA1	8q13	<18°C	Mecánico	8.0	Respuesta a lterada a bradiquin-ina, irritantes y hiperalgesia al frio reducida.	Alicina, icilina, mentol, aceite mostaza, hidroxinonenal, hidroxi-sanshool, cinnamaldehido, metilo de parahidroxibenzoato, formaldehido, acroleina.	Alcanfor, Gd³+, rojo rutenio, gentamicina, amiloride, HC- 030031, mentol, clopromazine, AP18	Voltaje, bradiquinia, diacilglicerlol, ácidos grasos poliinsaturados	DRG, cétulas pilosas, ovario, testículos, bazo.

Información tomada de referencias (1, 2, 3 y 4).

Tras la clonación de TRPV1, se identificaron otros receptores que respondían a estímulos térmicos. Así, destaca la clonación de TRPV2 (inicialmente nombrado VRL-1) que se activa con estímulos de calor intenso, activándose cuando la temperatura supera los 52ºC (2, 3, 6, 7). Por otro lado, se identificó el receptor TRPV3 que responde a temperaturas templadas alrededor de 33ºC. Recientemente se ha descrito que es también el receptor del sustancias pungentes presentes en el orégano y los clavos, así como el alcanfor (2, 6, 7). Un umbral de activación similar posee el receptor TRPV4 que originalmente se catalogó como un receptor activado por estímulos osmosensibles y, posteriormente, se ha observado que también transduce estímulos térmicos moderados entre 25-37ºC (2, 3, 7).

Los receptores capaces de responder a estímulos fríos no tardaron mucho en ser identificados. De nuevo, el grupo de David Julius, mediante una estrategia de expresión-clonación utilizando como ligando específico el mentol, identificó un receptor neuronal que se activaba por esta sustancia al que se le acuñó el nombre de CMR1 (de Cold Menthol Receptor I) (5). Al igual que con TRPV1, el fundamento de utilizar mentol fue la sensación de frescor que produce este compuesto en la boca o en la piel, sugiriendo una relación con la nocicepción al frío. Efectivamente, el receptor CMR1 era activado por temperaturas inferiores a 25ºC (Tabla II). Sorprendentemente, el análisis de la secuencia amino acídica de CMR1 en las bases de datos reveló que era idéntica a la de la proteína TRPM8, un polipéptido que se sobreexpresaba en cáncer de próstata y cuya función se desconocía (2, 3, 5, 7). Otro miembro de la familia TRPM implicado en termosensación es TRPM5 (Tabla II) (3, 7). Sin embargo, este receptor es más conocido por su participación sensorial al gusto, mediando la respuesta a sabores amargos, dulces y a amino ácidos (2, 3).

La sospecha de que podía haber un receptor que respondiera a temperaturas frías nocivas, condujo a la identificación de TRPA1 (originalmente ANKTM1). Este receptor se activa a temperaturas inferiores a 17°C (2, 6, 7), aunque existe cierta controversia sobre la activación por frío de este receptor en nociceptores (1, 2, 7). Trabajos recientes han demostrado que este receptor es activado por compuestos psicoactivos de la marihuana, así como sustancias irritantes y agentes pungentes, incluyendo acrolein, aceites de mostaza y canela y la alicina (Tabla II) (2, 6, 7). Por la particular estructura de su dominio N-terminal, compuesto por un gran número de dominios de anquirina, se pensó que este receptor podría también transducir estímulos mecánicos, pero los datos existentes en ratones carentes del canal TRPA1 cuestionan dicho papel (1, 2, 7).

TRPV1 UNA DIANA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR

De entre los canales TRP, el receptor TRPV1 se ha erigido como una diana crucial para en la transducción de señales dolorosas, especialmente en la etiología del dolor inflamatorio (2, 4, 8, 9). Su extensa distribución tisular y celular (Tabla III), junto a la potenciación de su actividad de canal iónico por mediadores pro-inflamatorios liberados durante un daño tisular, han situado a este receptor como un mediador crítico de la sensibilización inflamatoria de los nociceptores que resulta en la manifestación de hipersensibilidad en la zona dañada (1, 8, 11). Un cúmulo de resultados indica que TRPV1 participa en el inicio y mantenimiento de la inflamación neurogénica que suele acompañar a una injuria tisular. En este sentido la eliminación genética o farmacológica del receptor en animales produce una reducción del proceso inflamatorio que se traduce en una atenuación de la hiperalgesia térmica (2, 8, 10, 11).

A nivel celular, el receptor TRPV1 esta en una encrucijada de distintas rutas de señalización que son activadas por factores pro-algésicos produciendo la potenciación de su funcionalidad que, en último término, resulta en un incremento de la excitabilidad de los nociceptores (Figura 3). La sensibilización de TRPV1 puede deberse bien a activación directa de metabolitos que actúan como endovanilloides o a la potenciación de la función. La activación directa ha sido documentada para los compuestos anandamida, N-araquidonoil-dopamina (NADA), N-oleoildopamina y el ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico (12-HPETE) que actúan como agonistas incrementando la entrada de calcio al citosol neuronal (12, 13). Además, el pH ácido que se desarrolla en la zona inflamada también activa el receptor contribuyendo a incrementar más los niveles de Ca2+ intracelular y a despolarizar la membrana de los nociceptores. El Ca²⁺ a su vez ejerce de segundo mensajero activando rutas de señalización como la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa dependiente de calmodulina (CAMKII) que fosforilan al receptor alterando su funcionalidad. Hay que destacar la mayoría de estos agonistas reducen el umbral de activación térmica del receptor desde 42°C a 35°C, lo que se traduce en la activación del receptor a temperatura corporal produciendo hiperalgesia (8, 9, 11, 12). Este fenómeno es el que media la hipersensibilidad de una piel quemada por el sol a una ducha de agua templada.

regulación temperatura corporal, dolor Inflamación, prurito, hipersensibilidad. Alteraciones cognitivas, memoria, Hiperalgesia térmica y alodinia Dolor de pecho, hipertensión, Síntomas dolor de cabeza. de cabeza. mecánica dermatitis de contacto, prurigo nodulares, Isquemia cardíaca, hipertensión, migraña. Dermatitis atópica, dermatitis alergénica, eczema, psoriasis, alopecia, quemaduras quemaduras, amputación; vulvodinia, (neuralgia del trigémino, neuropatía diabética, neuralgia postherpética, Esquizofrenia, obesidad, migraña. Dolor inflamatorio y neuropático Neurodegeneración, Alzheimer, Tabla III. Distribución tisular de TRPVI Patología inflamación ocular. solares. Diferenciación y proliferación Termorregulación, regulación de la saciedad, control motor Modulación presión arterial, nocivos físicos y químicos. nodulación contracción Detección de estímulos egulación nociceptiva, de los queratinocitos, piogénica de Bayliss, crecimiento capilar. Termorregulación. apoptosis, prurito, ardioprotección. y cognitivo. Fibras sensoriales simpáticas Neuronas de DRG, TG, NG Queratinocitos, corpúsculos negra, hipocampo, córtex, cerebelo, bulbo olfatorio, Hipotálamo y sustancia dendríticas, estructuras mesencéfalo y cerebro de Meissner, folículos epiteliales de anclaje. Tipo celular pilosos, fibroblastos, mastocitos, células cardíacas. anterior. Te jido/Órgano Sistema Nervioso cardiovascular Periférico Sistema Cerebro Piel

Tabla III. Distribución tisular de TRPVI. (Continuación)

	Síntomas	Dolo abdominal crónico, isquemia, color de pecho, hipersensibilidad.	Dolor abdominal medio y superior, vómitos, shock e isquemia.	Hiperalgesia, alodinia. Aumento actividad refleja de la isquemia.	Alodinia mecánica, hiperalgesia. Cambios artríticos marcados en las articulaciones tibiotarsales.	Obstrucción pulmonar (tos).	
IABEA III. Distribucion usutal de IMI VI. (Commuacion)	Patología	Movilidad exagerada tracto gastrointestinal, enfermedad funcional del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, hemorroides.	Pancreatitis. Diabetes no dependiente de insulina, cáncer de páncreas.	Cistititis interstsicial, sobreactividad neurogénica del músculo detrusor, cistitis hemorragica dolorosa.	Osteoartritis, osteosarcomas.	Asma.	
11. Distribucion tisud	Función	Mantenimiento barrera mucosa.	Regulación glucemia y liberación insulina.	Contracción vejiga.	Papel mecánico.	Papel sensorial, generación tos no productiva.	Homeostasis coclear, audición.
I ABLA I	Tipo celular	Células de la región gastroduodenal. Plexo submucoso y mientérico.	Células de los islotes pancreáticos.	Terminales nerviosas sensoriales. Células epiteliales (urotelio). Músculo detrusor y fibroblastos.	Líquido sinovial de las articulaciones.	Fibras sensoriales.	Células pilosas, células de Hensen y célula satélite.
	Tejido/Órgano	Tracto intestinal	Páncreas	Vejiga	Hueso	Tracto respiratorio	Órgano de Corti

	Síntomas	Ardor de estómago.	Hiperalgesia y alodinia.
TABLA III. Distribución tisular de TRPVI. (Continuación)	Patología	Enfermedad del reflujo gastroesofageal, ulceras.	Inflamación bucal, inflamación dental
II. Distribución tisul	Función	Protección mucosa.	Nocicepción.
TABLA	Tipo celular	Células epiteliales del estómago.	Células de la papila gustativa, TG
	Tejido/Órgano	Estómago	Boca

Información tomada de referencias (1, 2, 3, y 4).

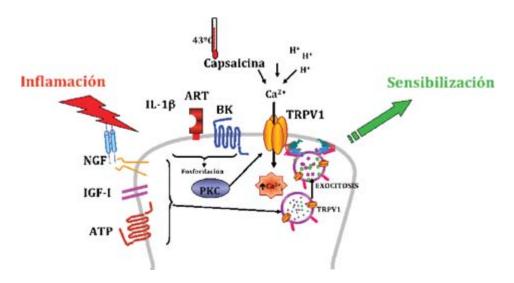


FIGURA 3. Rutas de señalización activadas por los agentes pro-inflamatorios que convergen en el receptor TRPV1, bien modificando su actividad o aumentando su expresión superficial y que conducen a la sensibilización de los nociceptores.

Complementariamente, los agentes pro-inflamatorios (neurotrofinas, interleuquinas, histamina, triptasa, bradiquinina, ATP, etc), actuando a través de sus receptores (Figura 3), activan rutas de señalización intracelular que convergen en el receptor TRPV1 modificando su funcionalidad y/o incrementando su expresión superficial. Así, los factores pro-algésicos estimulan rutas que involucran a la PKC, la proteína quinasa A (PKA), la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), la fosfolipasa C (PLC), y la quinasa de residuos de tirosina Src (2, 8, 11) (Figuras 2 y 3). La acción de estas quinasas sobre el receptor se traduce en un incremento de su actividad de canal iónico, resultante de una reducción de la temperatura de activación y una facilitación de la cinética de apertura del canal (8, 11). En paralelo, algunas de estas rutas, como la mediada por la PKC, también puede favorecer la movilización rápida a la superficie neuronal de una población vesicular de receptores TRPV1 residente cerca de la membrana plasmática (14, 15, 16). Por tanto, la mayor actividad y expresión del receptor TRPV1 en tejidos inflamados es una de las causas principales de la hiperexcitabilidad de los nociceptores que conduce a la manifestación de los dos síntomas característicos de la inflamación, a saber, la hiperalgesia y la alodinia. Consecuentemente, el control farmacológico de la actividad y/o expresión superficial de TRPV1 emergen como dos estrategias terapéuticas para el control de la inflamación y del dolor que la acompaña.

FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR TRPV1

La validación como diana terapéutica de TRPV1, y su implicación en una plétora de patologías, desde el dolor inflamatorio al oncológico (Tabla III), han propiciado el desarrollo de gran número de activadores e inhibidores del receptor para su uso como anti-inflamatorios y analgésicos. Entre los agonistas más populares y de mayor aplicación se encuentra la capsaicina (IC₅₀ =10 nM), que se ha venido utilizando en aplicaciones tópicas para el tratamiento de distintas afecciones (Tabla IV) (9, 12, 17). El fundamento de utilizar activadores de la actividad del receptor radica en que estos compuestos en presencia de Ca²⁺ extracelular promueven la desensibilización de TRPV1, un estado inactivo del receptor y altamente refractario a la reactivación. Por este motivo, se han establecido programas de descubrimientos de fármacos dirigidos a obtener agonistas más potentes que induzcan un estado desensibilizado más persistente. Entre estos agonistas cabe destacar el resiniferatoxina, una toxina aislada de Euphorbia resinifera, que inhibe la actividad de TRPV1 mucho más potentemente que capsaicina (IC₅₀=10 pM). Este compuesto ha mostrado una buena eficacia en modelos animales de incontinencia urinaria y dolor asociado a la neuropatía diabética (12, 17). A pesar del potencial terapéutico mostrado por estos agonistas, su biodisponibilidad oral es muy limitada, y está en parte restringido debido a la sensación de quemazón que acompaña su administración tópica. Es más, el hecho que la resiniferatoxina posea un esqueleto de éster de forbol ha levantado preocupación por su posible tumorigeneicidad (12, 17). Todo ello ha incitado a las compañías farmacéuticas a desarrollar compuestos con biodisponibilidad oral, desprovistos de los efectos secundarios mencionados. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados, los ligandos de nueva generación no han conseguido eliminar los efectos pungentes de la capsaicina. Como consecuencia, los últimos avances realizados en este campo han sido el uso de nuevas formulaciones galénicas de capsaicina como la transaicina (originalmente NGX-4010, NeurogesX) en parches dérmicos y ALGRX 4975 (Anesiva, originalmente de AlgoRx) para invecciones localizadas (Tabla IV) (9, 17).

Una alternativa a los agonistas de TRPV1 ha sido el desarrollo de antagonistas que induzcan la inhibición del receptor. El primero de los antagonistas caracterizado fue la capsacepina, un análogo restringido de la capsaicina que contiene un grupo tiourea. La capsacepina actúa como antagonista competitivo por cuanto que se une al sitio de unión de la capsaicina (12, 17). A pesar de comportarse con un antagonista potente *in vitro*, su aplicación en modelos animales ha rendido resultados contradictorios. Así, el compuesto no ha mostrado actividad analgésica ni antiinflamatoria en ratas, pero si ha atenuado la hiperal-

gesia térmica en cobayas. Otro de los compuestos desarrollado y ensayado ha sido la 5-yodo-resiniferatoxina, un derivado halogenado del agonista que lo convierte en un antagonista muy potente (12, 17). Este compuesto muestra una actividad analgésica *in vitro* más constante y reproducible por lo que se está considerando su desarrollo clínico para el tratamiento de la incontinencia urinaria. No obstante, al igual que para la resiniferatoxina, su biodisponibilidad oral es nula, y contiene el éster de forbol que posee un potencial tumorigénico. Además, la síntesis química del compuesto es notablemente elevada, implicando más de 45 etapas de reacción (12).

En un intento de desarrollar antagonistas competitivos con biodisponibilidad oral, las empresas farmacéuticas han usado ensayos de alto rendimiento para rastrear quimiotecas compuestas por miles a millones de compuestos químicos. Como resultado, se han aislado y caracterizado una abundancia de moléculas con una buena actividad antagonista *in vitro* y en modelos animales. La optimización estructural y funcional de los mejores candidatos ha rendido inhibidores orales de TRPV1 con un aparente buen perfil terapéutico (9, 12, 17). Entre estos cabe destacar los compuestos SB-705498, NGD-8243, AMG-517, y GRC-621, que están en estos momentos en distintas fases de desarrollo clínico (Tabla IV).

Una segunda familia de inhibidores de TRPV1 que se ha estado explorando la constituyen los antagonistas no competitivos y acompetitivos, que se unen al receptor en sitios de unión distintos al de la capsaicina (12, 13). Entre estos compuestos destaca el rojo de rutenio y los péptidos ricos en residuos de arginina que actúan como potentes bloqueantes pero sin valor terapéutico debido a su excesiva toxicidad. El uso de una aproximación de química combinatoria identificó a las moléculas DD161515 y DD191515 como potenciales antagonistas no competitivos con actividad analgésica y anti-inflamatoria in vivo (12, 13, 17). Estas propiedades farmacológicas fueron mejoradas con la obtención del compuesto DD01050, un análogo 10 veces más potente in vitro e in vivo. Sin embargo, el buen perfil terapéutico de DD01050 quedó enmascarado por su todavía elevada toxicidad que ha frenado su desarrollo clínico (12). No obstante, estos estudios han identificado los principios químicos y farmacológicos requeridos para poder obtener antagonistas acompetitivos con mejores propiedades y baja toxicidad. Un ejemplo de esta nueva generación de moléculas lo representa la identificación de la methoctramina (9, 12). Este compuesto bloquea a TRPV1 en cultivos primarios de nociceptores con un mecanismo dependiente del voltaje, siendo la inhibición mayor a potenciales de membrana negativos que ha positivos. No obstante, la actividad anti-inflamatoria y analgésica de este compuesto no se ha descrito todavía.

TABLA IV. Agonistas y antagonistas de TRPVI en desarrollo clínico

Nombre	Compuesto	Сотрайа	Acción	Ruta	rpuesto Compañía Acción Ruta Indicaciones	Fase clínica
	Capsaicina	NeurogenX	Agonita	Parche transdérmico	Dolor asociada a la neuropatía del SIDA	Fase III
	Civamida (Cis-capsaicina)	Winston Laboratorios	Agonista	Intranasal, tópico	Migraña, Dolor de cabeza, osteoartritis	Fase III (dolor de cabeza, osteoartritis)
	Capsaicina	Anesiva	Agonista	Inyección	Dolor	Fase II (migraña)
						Fase II
	SB-705498	GlaxoSmith-Kline	Antagonista	Oral	Migraña, dolor dental	Fase II (migraña) Fase I (dolor dental)
	NGD 8243 AMG 517 GRC 6211	Neurogen/Merck Amgen Glenmark	Antagonista Antagonista Antagonista	Oral Oral Oral	Dolor Dolor Osteoartritis, dolor dental, incontinencia urinaria, dolor neuropático	Fase II Fase I Fase I

Información tomada de referencias (9, 12, y 17).

Resulta muy notable que, aun después del enorme esfuerzo científico y económico realizado en los últimos años en la búsqueda y desarrollo de antagonistas de TRPV1, el número de estos compuestos que han progresado a ensayos clínicos en humanos es marcadamente pobre (Tabla IV). La base de datos de ensayos clínicos del NIH registra únicamente tres ensayos clínicos en fase II para el compuesto SB-705498 de GlaxoSmithKline, a saber, NCT-00269022 en el que el compuesto se esta ensayando para migraña; NCT-00281684 en que se esta testando en dolor dental tras cirugía; y, NCT-00461682 para dolor rectal (9, 17). Además, otras compañías como Amgen (AMG-517) Glenmark (GCR-6211) y Neurogen/Merck (NGD-8243) han declarado la realización de ensayos clínicos en fase I con sus compuestos. El ensayo realizado por Amgen tuvo que ser abortado al observar que el compuesto AMG-517 producía una marcada hipertermia en los voluntarios del estudio. Un posterior análisis en modelos animales reveló que, efectivamente, el bloqueo potente de TRPV1 aumentaba la temperatura corporal entre 1-3°C (18). Este resultado sugiere que TRPV1 esta tónicamente activo en condiciones fisiológicas y que esta actividad es fundamental para la regulación de la temperatura corporal (18). En apoyo de esta hipótesis se ha descrito que TRPV1 contribuye a la generación de la fiebre polifásica inducida por el pirógeno bacteriano liposacarido (LPS) (19). Conjuntamente, todos estos estudios sugieren que el bloqueo indiscriminado del receptor TRPV1 con potentes antagonistas puede conllevar a efectos secundarios intolerables terapéuticamente. No es de extrañar, por tanto, que muchas compañías farmacéuticas hayan abortado los ensayos clínicos iniciados. No obstante, aunque el uso sistémico de estos compuestos sea inaceptable, su aplicación tópica es todavía una opción válida que se está explorando.

LOS COMPLEJOS PROTEICOS DE TRPV1 COMO DIANAS TERAPÉUTICAS

Al igual que otros canales TRP, el receptor TRPV1 no se encuentra en la membrana celular como una entidad aislada, sino que está formado parte de complejos proteicos que constituyen redes de señalización celular. Estos ensamblados proteicos controlan desde el transporte del receptor a la membrana neuronal hasta su funcionalidad una vez incorporado en la superficie de la célula. En los últimos años se ha producido un avance notable en la identificación de los componentes moleculares que forman parte de estos macrocomplejos (8, 11). Así, el rastreo de genotecas derivadas de mRNA neuronal mediante la técnica del doble-híbrido en levaduras, ha identificado proteínas que interaccionan

con los dominios intracelulares de TRPV1, algunas de ellas modulan la actividad de canal iónico (8). Uno de estos rastreos identificó las proteínas vesiculares, sinaptotagmina IX y snapin, que están implicadas en la exocitosis neuronal dependiente de Ca²⁺ y mediada por el llamado complejo SNARE (14). A diferencia de la exocitosis constitutiva, la fusión vesicular mediada por proteínas SNARE se produce en respuesta a una señal extracelular que aumenta la concentración del ión Ca²⁺ en el citosol celular. La exocitosis regulada juega un papel clave en muchos procesos neuronales, incluyendo la sinpatogénesis y la potenciación de larga duración, un fenómeno sináptico implicado en la memoria y aprendizaje. Por tanto, la interacción de TRPV1 con proteínas del complejo SNARE inmediatamente sugirió que las neuronas podrían modular la actividad del receptor regulando sus niveles de expresión superficial en respuesta a estímulos ambientales (14). En este sentido, la activación de la PKC directamente con ésteres de forbol, o mediante la exposición celular a las neurotrofinas NGF e IGF-1, dos agentes pro-inflamatorios, aumentaba notable y rápidamente la expresión superficial de TRPV1 en las membranas (14-16). Este incremento era prevenido en gran medida por el tratamiento de la toxina botulínica, un bloqueante específico de la exocitosis neuronal (14). Estos estudios claramente sugirieron que la sensibilización inflamatoria de los nociceptores implicaba un incremento en la expresión superficial del receptor TRPV1, y que el bloqueo de este aumento podría tener una relevancia terapéutica importante. De hecho, estudios recientes de nuestro grupo en nociceptores en cultivo han demostrado que la inhibición de la exocitosis neuronal regulada mediante péptidos que interfieren con el complejo SNARE, elimina la sensibilización inflamatoria de TRPV1 y de los nociceptores, sin alterar la actividad del canal. Resultados preliminares en modelos animales muestran que estos péptidos poseen actividad anti-inflamatoria y analgésica.

CONCLUSIONES Y PANORÁMICA

Cada vez es más claro que los canales TRP son cardinales en la fisiología sensorial y que su alteración funcional, bien mediante mutaciones o por estímulos nocivos o factores pro-inflamatorios, conduce a estados patológicos indicando que estos dispositivos moleculares son dianas terapéuticas. El desarrollo de compuestos que controlen su actividad patológica es, por tanto, un objetivo fundamental en neurofarmacología. De experiencias y resultados previos hemos de aprender que la inhibición indiscriminada de estos receptores (fisiológicos y patológicos) conduce a efectos secundarios que enmascaran su beneficio tera-

péutico. Por ello, es esencial el diseño de compuestos que interaccionen preferentemente sobre los receptores patológicamente activados. Los antagonistas acompetitivos que actúen como bloqueadores de canal abierto son una alternativa válida, por cuanto estos compuestos se unirán mayoritariamente a aquellos canales que están hiperactivados (abiertos). Una estrategia alternativa es actuar sobre los complejos multiproteicos que contienen estos canales y que contribuyen crucialmente a la señalización celular y a la patología. La identificación de los componentes moleculares de estas redes proteicas pavimenta el camino para la validación de nuevas dianas terapéuticas útiles para el tratamiento de las alteraciones patológicas que implican los canales TRP. El futuro nos demostrará si estas aproximaciones rinden compuestos con índices terapéuticos superiores que, especialmente, tengan eliminados, o al menos, marcadamente disminuidos los efectos secundarios de los productos actuales.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la contribución de todos los miembros de mi grupo de investigación, y a mis colaboradores G. Fernández, R. Planells, C. Belmonte, A. Messeguer, E. Pérez, F. Viana, A. Gomis, A. Fernández, M. Caprini, F. Albericio y C. Carreño, responsables de gran parte del progreso realizado en los últimos años. Los proyectos han sido financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación, La Generalitat Valenciana, La Fundación Ramón Areces, La Fundació la Marató de TV3, y DiverDrugs, SL.

REFERENCIAS

- (1) Belmonte, C. y Viana, F. (2008) Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol. Pain.* 4: 14.
- (2) VENKATACHALAN, K. Y MONTELL, C. (2007) TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 387-417.
- (3) TALAVERA, K.; NILIUS, B. Y VOET, T. (2008) Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends Neurosci.* 31: 287-295.
- (4) NILIUS, B.; OWSIANIK, G.; VOETS, T. Y PETERS, J. (2007) Transient receptor potential channels in disease. *Physiol. Rev.* 87: 165-217.
- (5) JORDT, S.E.; McKemy, D.D. y Julius, D. (2003) Lessons from Peppers and peppermint: the molecular logic of thremosensation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:, 487-492.

- (6) Bandell, M.; MacPherson, L.J. y Patapoutian, A. (2007) From chilis to chilis: mechanisms of thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17: 490-497.
- (7) DHAKA, A.; VISWANATH, V. Y PATAPOUTIAN, A. (2006) The ion TRP channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 135-161.
- (8) PLANELLS-CASES, R.; GARCIA-SANZ, N.; MORENILLA-PALAO, C. Y FERRER-MONTIEL, A (2005) Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 451: 151-159.
- (9) Planells-Cases, R. y Ferrer-Montiel, A. (2007) Drug design and development through the vanilloid receptor. *Exp. Opin. Drug. Discov.* 2: 1053-1063.
- (10) CATERINA, M.J. Y JULIUS, D.D. (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 487-517.
- (11) Huang, J.; Zhang, X. y McNaughton, P.A. (2006) Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr. Neuropharm.* 4: 197-206.
- (12) Messeguer, A.; Planells Cases, R. y Ferrer-Montiel, A (2006) Physiology and pharmacology of the vanilloid receptor. *Curr. Neuropharmacol.* 4: 1-9.
- (13) PLANELLS-CASES, R.; GARCIA-MARTINEZ, C.; ROYO, M.; PEREZ-PAYÀ, E.; CARREÑO, C.; ALBERICIO, F.; MESSEGUER, A. Y FERRER-MONTIEL, A (2003) Small molecules targeting the vanilloid receptor complex as drugs for inflammatory pain. *Drugs of Future* 28: 787-795.
- (14) Morenilla-Palao, C.; Planells-Cases, R.; Garcia-Sanz, C. y Ferrer-Montiel, A. (2004) Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J. Biol. Chem.* 279: 25665-25672.
- (15) Zhang, X.; Huang, J. y McNaughton, A. (2005) NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* 24: 4211-4223.
- (16) VAN BUREN, J.J.; BHAT, S.; ROTELLO, R.; PAUZA, M.E.; PREMKUMAR, L.S. (2005) Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol. Pain.* 1, 17:1-11.
- (17) SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D.N.; BLUM, C.A. Y EID, S.R. (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonists proof-of-concept. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 6: 357-372.
- (18) GAVVA, N.R.; BANNON, A.W.; SURAPANENI, S.; HOVLAND, D.N. JR.; LEHTO, S.G.; GORE, A.; JUAN, T.; DENG, H.; HAN, B.; KLIONSKY, L.; KUANG, R.; LE, A.; TAMIR, R.; WANG, J.; YOUNGBLOOD, B.; ZHU, D.; NORMAN, M.H.; MAGAL, E.; TREANOR, J.J. Y LOUIS, J.C. (2007) The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J. Neurosci.* 27: 3366-3374.

- (19) IIDA, T.; SHIMUZI, I.; NEALEN, M.L.; CAMBELL, A. Y CATERINA, M. (2005) Attenuated fever response in mice Licking TRPV1. *Neurosci. Lett.* 378: 28-33.
- (20) Voets, T.; Talavera, K.; Owsianik, G. y Nilius, B. (2005) Sensing with TRP channels. *Nat. Chem. Biol.* 1: 85-92.

3. La maquinaria molecular de la exocitosis: ¿un nuevo marcador en las enfermedades neurodegenerativas?

DIEGO BUSTILLO MERINO, YOLANDA GUTIÉRREZ MARTÍN Y ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO

RESUMEN

Entre los procesos de tráfico intracelular de membranas destaca la exocitosis como mecanismo fundamental de la liberación de mediadores celulares. La exocitosis implica la fusión de la membrana de una vesícula secretora con la membrana plasmática y el establecimiento de una solución de continuidad entre el interior vesicular y el medio externo que posibilita la liberación del mediador. La exocitosis de neurotransmisores es parte esencial de la transmisión sináptica y, por extensión, del funcionamiento del sistema nervioso. El descubrimiento de las proteínas SNA-RE («soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment protein receptor») constituyó un hito fundamental en la investigación de los mecanismos del tráfico de membranas, disponiéndose en la actualidad de un conocimiento detallado de las isoformas responsables de la exocitosis. La liberación de neurotransmisores es un proceso altamente regulado en el tiempo y en el espacio que se desencadena en respuesta a un incremento fugaz y localizado de la concentración citosólica de calcio. Ello implica la existencia de una maquinaria proteica propia de la exocitosis neuronal que posibilite la extraordinaria rapidez, segregación espacial y fiabilidad necesarias para la transmisión sináptica. En este trabajo se revisan los aspectos moleculares y funcionales de las principales proteínas de la maquinaria exocitósica neuronal y se mencionan algunos hallazgos recientes que vinculan dichas proteínas con determinadas enfermedades neurodegenerativas.

Palabras clave: Exocitosis. Proteínas SNARE. Vesícula sináptica. Enfermedad neurodegenerativa. Tráfico de membrana.

ABSTRACT

The exocytotic molecular machinery: a new marker for neurodegenerative diseases?

Exocytosis constitutes one of the most fascinating and thoroughly studied steps within the intracellular membrane traffic. By fusing the membrane of a transport vesicle with the plasma membrane, cells may extrude substances stored in the vesicle and, thus, send a message to either neighbour or distantly located cells. The exocytotic release of neurotransmitter molecules is an essential part of synaptic transmission, a process that underlies the functioning of the nervous system. The discovery of the SNAREs («soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment protein receptor») was a milestone in the investigation of the mechanisms involved in membrane traffic that paved the way for our current knowledge of the isoforms involved in the exocytotic step. The release of neurotransmitters is a tightly regulated process that is triggered by short-living and very much localized rises in the cytosolic concentration of calcium. This implies the existence of a set of specific proteins that allows for the velocity, spatial confinement al reliability characteristic of synaptic transmission. In this work, we review the molecular and functional aspects of the main components of the neuronal exocytotic machinery and pay attention to recent findings that relate some of those proteins with certain neurodegenerative diseases.

Keywords: Exocitosis. SNARE proteins. Synaptic vesicle. Neurodegenerative disease. Membrane traffic.

INTRODUCCIÓN

Procesos aparentemente tan dispares como el crecimiento y movimiento celulares, la reparación de membranas o la transmisión sináptica en las células eucarióticas se producen gracias a la existencia de un tráfico de membranas. El tráfico de membranas implica la formación de vesículas desde un compartimento membranoso de origen, el transporte de la mismas y, en último término, su fusión con un compartimento de destino. Con independencia de la enorme diversidad en el tamaño y forma de dichos compartimentos u organelas membranosas, las reacciones principales —fisión y fusión de membranas— están a cargo de complejos supramoleculares formados por proteínas ampliamente conservadas a lo largo de la escala evolutiva. Fue en la década de los años

ochenta del pasado siglo cuando con el descubrimiento de las proteínas SNA-RE (acrónimo de «soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment protein receptor») se inició una productivísima línea de investigación que ha llevado a la comprensión a nivel molecular de los procesos de fusión de membranas y al reconocimiento de estas proteínas como efectoras principales de los mismos (con la excepción de la fusión de membranas extracelulares, de las de las mitocondrias y los peroxisomas) (1). Las proteínas SNARE se localizan en las membranas destinadas a fusionarse e interactúan entre sí constituyendo complejos (complejo SNARE o complejo de fusión) que consiguen aproximar ambas membranas. Es precisamente la energía liberada durante la formación de dichos complejos la que se emplea en la fusión de membranas, mientras que la disociación del complejo —y el consiguiente reciclado de sus componentes— tiene lugar tras la fusión vesicular y requiere del concurso del NSF, una ATPasa que a través de la hidrólisis de ATP provee la energía necesaria para todo el proceso.

La exocitosis constituye un caso particular de tráfico de membranas en virtud de la cual la membrana de una vesícula se fusiona con la membrana plasmática posibilitando la liberación del contenido vesicular —neurotransmisores, hormonas y otros mediadores celulares— al exterior celular. La liberación de neurotransmisores ocurre en las terminaciones nerviosas mediante la exocitosis de las vesículas sinápticas (neuroexocitosis). La neuroexocitosis presenta características propias como la de tener lugar en regiones especializadas de la membrana neuronal denominadas zonas activas y producirse con extraordinaria rapidez en respuesta a un incremento local (microdominio) de la concentración citosólica de calcio. En la neuroexocitosis cabe distinguir tres etapas que se producen secuencialmente: a) interacción de la vesícula sináptica con la membrana plasmática («docking» o atraque vesicular); b) maduración vesicular para alcanzar competencia secretora («priming»), y c) fusión de membranas desencadenada por la entrada de calcio inducida por un potencial de acción (2). En este proceso se emplean las proteínas de la maquinaria general de fusión de membranas (proteínas SNARE, NSF, α-SNAP, proteínas SM y Rab) pero precisa también de componentes proteicos específicos como las complexinas, sinaptotagmina y munc13 (3). Cabe finalmente apuntar que una vez que se produce la exocitosis, el tráfico de membranas discurre en sentido contrario, desde la membrana plasmática hacia el interior celular, empleando el mecanismo de la endocitosis (fisión de membranas) mediante el que las células recuperan y, frecuentemente, reciclan las membranas vesiculares que son utilizadas en nuevos eventos exocitósicos (Figura 1).

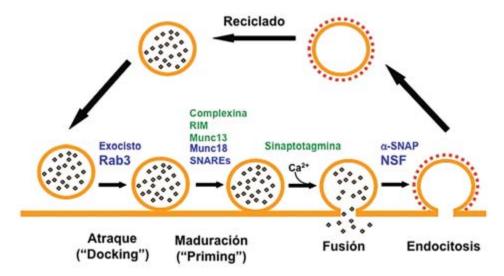


FIGURA 1. Etapas fundamentales del ciclo de las vesículas sinápticas y componentes proteicos de la maquinaria general de la exocitosis (en color azul) y de la exocitosis regulada de las vesículas sinápticas (en color verde). Antes de liberar su contenido al exterior celular mediante el mecanismo de la exocitosis (fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática), las vesículas sinápticas deben entrar en contacto con la membrana plasmática (atraque o «docking») y adquirir competencia secretora (maduración o «priming»). Una vez que se ha producido la fusión de membranas, la membrana vesicular es recuperada mediante la endocitosis y posteriormente reciclada formándose nuevas vesículas.

LAS PROTEÍNAS SNARE

Las proteínas SNARE forman una superfamilia que en los humanos cuenta con 36 miembros (4). Presentan una estructura sencilla, con un motivo SNARE característico formado por 60-70 aminoácidos agrupados en septetos repetidos (5). Así mismo, suelen disponer de un único dominio transmembrana unido mediante un pequeño péptido conector al extremo carboxilo del motivo SNARE, mientras que al extremo amino de dicho motivo pueden añadirse diversos dominios que constituyen la principal fuente de variabilidad entre las proteínas SNARE. Existen, no obstante, algunas excepciones a este patrón estructural. Es el caso de las brevinas, que carecen de dominio aminoterminal, o de SNAP-25 («25-kDa synaptosome-associated protein»), una SNARE neuronal que carece de dominio transmembrana pero que posee dos motivos SNARE unidos por un región conectora palmitoilada que posibilita su anclaje a las membranas celulares (Figura 2A).

Motivos SNARE

La formación del complejo de fusión entre las proteínas SNARE de las membranas que van a fusionarse está mediada por los motivos SNARE. Los motivos SNARE carecen de una estructura definida en los monómeros de las proteínas; sin embargo, cuando las proteínas SNARE entran en contacto, sus motivos SNARE adoptan espontáneamente la conformación de hélice alfa formando complejos de extraordinaria estabilidad constituidos por 4 hélices alfa entrelazadas —superhélices—, en los que cada hélice corresponde a un motivo SNARE diferente (Figura 2B) (6, 7). En el interior del haz formado por estas 4 hélices alfa se sitúan 16 capas o anillos (numerados desde -7 hasta +8, comenzando por el extremo amino) integrados por las cadenas laterales de aminoácidos pertenecientes a los distintos motivos SNARE. Estos anillos son de carácter hidrofóbico con la excepción del anillo en posición media (capa «0») que contiene tres residuos de glutamina (Q) y uno de arginina (R) (Figura 2C) (8). Atendiendo a la presencia de estos aminoácidos, las proteínas SNARE se clasifican en Q y en R. A su vez, dependiendo de la posición del motivo SNARE en seno de la proteína, las SNARE Q se subdividen en Oa, Ob y Oc — y Obc— (3), debiendo asociarse siempre en combinaciones heteroméricas plenas (QaQbQcR o QaQbcR) y disponerse de forma paralela para poder constituir complejos productivos, capaces de inducir la fusión de membranas (1, 9). Como se ha mencionado, el dominio aminoterminal de la proteína SNARE constituye la región de mayor variabilidad, cumpliendo funciones diversas entre las que se encuentran la de plegarse sobre el motivo SNARE, forzando una conformación «cerrada» de la proteína que impide su participación en los complejos de fusión, y la de mediar la interacción con proteínas como las SM (véase más adelante) (10, 11). La formación del complejo de fusión probablemente tiene lugar en dos etapas, consistentes en la formación de un complejo intermediario OaObOc en la membrana plasmática y la posterior asociación con una SNARE R vesicular (12, 13). Este ensamblaje secuencial se vería favorecido por el hecho de que las proteínas SNARE Q no se distribuyen uniformemente en la membrana plasmática sino que se agrupan en regiones ricas en colesterol sobre las que las vesículas (SNARE R) tenderían a fijarse, lográndose, en consecuencia, una mayor eficiencia en los procesos de fusión de membranas (Figura 3) (14, 15).

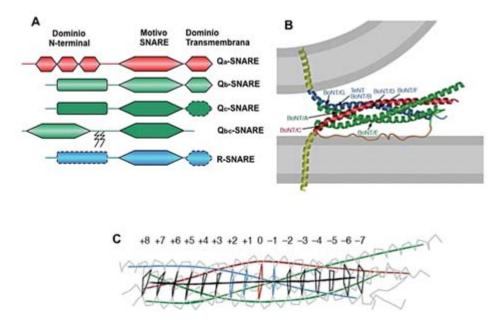


FIGURA 2. Estructura de las proteínas SNARE («soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor — NSF— attachment protein receptor») y del complejo de fusión. A. Organización de los dominios en las distintas familias o tipos de proteínas SNARE (Qa, Qb, Qc, Qbc y R). Aquellas regiones limitadas por líneas discontinuas representan dominios cuya presencia no es constante en todos los miembros de la familia. B. Estructura tridimensional del complejo de fusión neuronal en configuración trans obtenida mediante análisis de difracción de rayos X. El complejo adopta la forma de un cilindro de 120 Å de longitud y diámetro trasversal variable formada por los motivos SNARE de la sinaptobrevina 2 (azul), la sintaxina 1 (rojo) y SNAP-25 (verde). Se muestran también los lugares de actuación de las toxinas clostridiales: tetánica (TeNT) y botulínicas (BoNT/) A, B, C, D, E, F y G. Tomado de la ref. 6. C. Esquema de la porción central del complejo de fusión mostrando las 16 «capas» formadas por las cadenas laterales de los aminoácidos de los motivos SNARE dispuestas a ambos lados de una capa central «0». En negro se muestra el eje de la superhélice y en azul, rojo y verde las hélices de la sinaptobrevina, la sintaxina 1 y SNAP-25, respectivamente. Tomado de la ref. 8.

EL CICLO DE LAS PROTEÍNAS SNARE Y LA FUSIÓN DE MEMBRANAS

Aunque inicialmente se postuló que el NSF actuaba sobre el complejo SNA-RE induciendo la fusión de membranas, actualmente se cree que es el ensamblaje del complejo y no su disociación el desencadenante del proceso de fusión. Por su parte, el NSF se encargaría de garantizar la generación de formas monoméricas de las proteínas SNARE y, por tanto, su disponibilidad para promover repetidamente reacciones de fusión.

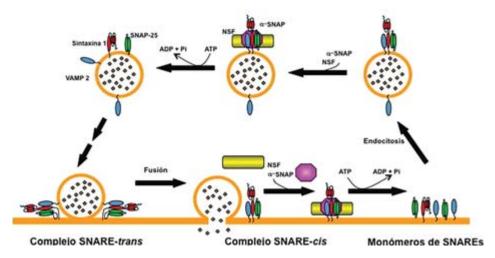


FIGURA 3. El ciclo de las proteínas SNARE. La proteínas SNARE adoptan dos configuraciones extremas: formas monoméricas y complejos SNARE cis. Las proteínas SNARE situadas en las membranas destinadas a fusionarse forman inicialmente complejos en configuración trans, con la consiguiente aproximación de las dos membranas. Durante la exocitosis, los complejos adoptan la configuración cis en la que las proteínas SNARE se encuentran ancladas a la misma membrana. NSF y O-SNAP actúan después de la exocitosis disociando los complejos cis situados en la membrana plasmática y en las vesículas endocíticas generando monómeros de SNAREs.

Un aspecto clave en el ensamblaje productivo del complejo de fusión es la adopción de una configuración *trans* en la que al menos una proteína SNARE se encuentra en cada una de las membranas destinadas a fusionarse. Esta circunstancia determina que el ensamblaje del complejo mediante el entrecruzamiento de los motivos SNARE se produzca, como si de una cremallera se tratase, desde el extremo amino hacia el carboxilo al tiempo que se genera la fuerza suficiente para aproximar las dos membranas y vencer las barreras energéticas para su fusión (6, 16, 17). Hoy día se piensa que el mecanismo molecular por el que las vesículas adquieren competencia secretora («priming») es precisamente el ensamblaje del complejo SNARE (18, 19).

Es de destacar que durante la fusión de membranas los complejos SNARE trans adoptan la configuración cis, en la que todas las proteínas SNARE se encuentran ancladas a la misma membrana. Dichos complejos son biológicamente inactivos hasta que son disociados mediante la acción de NSF, con el consiguiente gasto energético (20). NSF es un hexámero perteneciente a la familia de las proteínas AAA+ («ATPases associated with various cellular activities»), caracterizadas por presentar dos dominios de unión a nucleótidos —uno de ellos con actividad catalítica y el otro responsable de la hexamerización— y actuar como

chaperonas (21). Por ello, NSF no actúa directamente sobre el complejo SNA-RE sino que lo hace a través de cofactores conocidos como SNAPs («soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor —NSF— attachment proteins»), que incluyen tres isoformas denominadas α , β y γ . Es necesaria la unión de tres moléculas de SNAP al complejo SNARE para poder reclutar y, subsiguientemente, activar al NSF (22, 23). Se cree que son necesarios varios ciclos catalíticos con hidrólisis de otras tantas moléculas de ATP para disociar un complejo SNARE en configuración cis. El desensamblaje de los complejos SNARE resulta crucial para el mantenimiento de las reacciones de fusión en cualquier vía secretora (Figura 3).

LAS PROTEÍNAS SM

Otro componente esencial de la maquinaria molecular de la fusión de membranas son las proteínas SM (24, 25). Se trata un grupo de 7 proteínas solubles de pequeño tamaño molecular (650-700 aminoácidos) relacionadas con Sec1/Munc18. Munc18-1 ha sido implicada en procesos tan diversos como los de estabilizar la conformación cerrada de la sintaxina 1 (Figura 4) (11, 26), favorecer la constitución de complejos entre proteínas SNARE de tipo Q que servirían de aceptores de proteínas R durante el ensamblaje del complejo de fusión o la formación de complejos estables con proteínas solubles como Mint (27, 28). Esta variedad de funciones ha motivado que se le hayan asignado papeles diversos y a veces contradictorios en la regulación de la exocitosis, facilitando o inhibiendo la formación del complejo SNARE («priming») (29-31), promoviendo el atraque vesicular («docking») (32) e incluso acelerando la expansión del poro de fusión (fusión de membranas) (33).

LAS PROTEÍNAS RAB

Las proteínas Rab forman parte de la superfamilia Ras de GTPasas (proteínas G) de pequeño tamaño molecular (monoméricas) e intervienen en múltiples etapas del tráfico intracelular de membranas (34-36). En el ser humano se han descrito más 60 proteínas Rab distintas, entre las que destaca Rab3 por su implicación en la exocitosis regulada de hormonas y neurotransmisores (37). Rab3 presenta 4 isoformas, Rab3A, B, C y D, que poseen una distribución diferencial en neuronas y células endocrinas. Rab3A es la isoforma más abundante en el cerebro, encontrándose en la práctica totalidad de las sinapsis (38). Como el resto de las GTPasas de pequeño tamaño, las proteínas Rab transitan entre el citosol

y la membrana vesicular (Figura 4 y 5). Este tránsito —ciclo de las proteínas Rab— es posible gracias a los cambios conformacionales que experimenta la proteína en función del núcleotido de guanina (GTP o GDP) al que esté unida. Esta dualidad conformacional provee a las proteínas Rab de la capacidad de actuar como interruptores moleculares, de manera que la forma unida a GTP se encuentra activada y asociada a membranas (posición «on» del interruptor), y la forma unida a GDP se encuentra inactiva y localizada en el citosol (posición «off») (Figura 4 y 5). En cada sistema celular el balance entre ambas formas está regulado por proteínas activadoras de GTPasas («Rab GTPase activating proteins»; RabGAP), que favorecen la conversión de la forma activa de Rab en la inactiva, y por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina («Rab guanine nucleotide exchange factors»; RabGEF) que desplazan el equilibrio conformacional en sentido contrario. Rab3A experimenta un ciclo de asociación y disociación de las vesículas sinápticas durante la estimulación de la exocitosis dependiente de calcio. Al igual que las demás proteínas Rab, la forma de Rab3A unida a GTP está anclada a la membrana a través de un grupo geranilgeranilo unido covalentemente a la proteína Rab mediante una reacción catalizada por una geranilgeraniltransferasa (RabGGT) y la asistencia de diversas proteínas acompañantes («Rab escort proteins»; REP). Cuando se estimula la exocitosis, el GTP unido a Rab3A es hidrolizado a GDP y el complejo resultante Rab3A-GDP se disocia de la membrana vesicular con el concurso del inhibidor de la disociación de GDP («GDP dissociation inhibitor»; RabGDI) (39). El estricto acoplamiento entre la exocitosis y el ciclo de Rab3A ha llevado a sugerir que esta proteína y también sus isoformas— regularían la direccionalidad del tráfico vesicular (39, 40). En concreto, se ha propuesto que Rab3A intervendría en el proceso de reclutamiento y en el atraque de las vesículas en las zonas activas durante la estimulación nerviosa (Figura 4A) (41). Así mismo, se ha atribuido a Rab3A la capacidad de incrementar la eficacia transductora de los potenciales de acción por la maquinaria secretora y de acoplar la actividad exocitósica con la endocitósica (42-44). Esta variedad de papeles es posible gracias a la interacción de la forma activa de Rab3A con proteínas como la rabfilina, RIM, Noc2, PRA1 o la calmodulina, que actuarían como las verdaderas efectoras de las acciones de Rab3A. La rabfilina es una proteína soluble que es reclutada por Rab3A para la membrana de las vesículas sinápticas y que a través de la interacción con SNAP-25 podría, en parte, mediar los efectos de Rab3A sobre el atraque vesicular en células neuroendocrinas y el acoplamiento entre la exocitosis y la endocitosis en neuronas (44, 45). Por su parte, Noc2 parece intervenir fundamentalmente en los efectos de Rab3A sobre la exocitosis de las células neuroendocrinas (46), mientras que PRA1 («prenilated Rab acceptor 1») es una proteína ampliamente conserva-

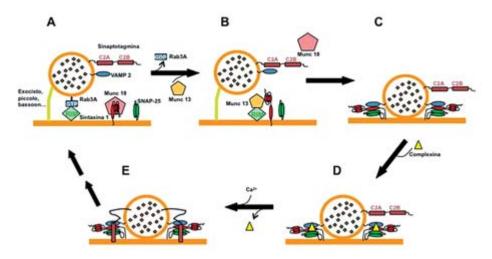


FIGURA 4. Modelo molecular de la exocitosis de las vesículas sinápticas. A. Vesícula sináptica atracada a la membrana mediante las proteínas del exocisto y la interacción entre RIM y Rab3A unida a GTP. En esta etapa, Munc18 estabiliza la conformación cerrada de sintaxina 1. B. La hidrólisis del GTP determina la disociación de Rab3A de la membrana de la vesícula sináptica y de RIM, que puede entonces interactuar con Munc 13 para que compita con Mucn18 por unirse a la sintaxina 1. La unión de Munc13 a la sintaxina 1 facilita que ésta adopte la configuración abierta necesaria para formar parte del complejo SNARE. C. Ensamblaje del complejo SNARE—sintaxina 1, sinaptobrevina y SNAP-25— en la configuración trans con la aproximación de las membranas destinadas a fusionarse. D. La complexina se una al complejo SNARE estabilizándolo en un estado metaestable. E. El incremento de la concentración citosólica de calcio promueve la unión de la sinaptotagmina a los fosfolípidos de la membrana celular y al complejo SNARE, desplazando a la complexina y desencadenando la exocitosis.

da a lo largo de la escala evolutiva que se une a distintas proteínas G de pequeño tamaño preniladas —unidas covalentemente a grupos geranilgeranilo—, incluyendo a Rab3A (47, 48). PRA1 se encuentra en el complejo de Golgi donde participaría en procesos de génesis vesicular y en la incorporación de la sinaptobrevina 2 a las vesículas recién formadas (47, 49). Además, se ha descrito que PRA1 puede asociarse a las vesículas sinápticas e interactuar con piccolo, una proteína constituyente de las zonas activas, lo que sugiere que PRA1 podría también mediar los efectos de Rab3A sobre el atraque vesicular (50). La calmodulina es también capaz de unirse a Rab3A y facilitar su disociación de la membrana vesicular de forma dependiente de la elevación citosólica de calcio (51). Se ha propuesto que esta interacción estaría implicada en alguno de los efectos de Rab3A en la exocitosis regulada de las células endocrinas (52). RIM («Rab3A-interacting molecule») se localiza específicamente en las zonas activas y a su función en la exocitosis neuronal dedicaremos un apartado más adelante.

EL EXOCISTO O COMPLEJO DE ATRAQUE VESICULAR

El reconocimiento de la membrana de destino constituye un mecanismo fundamental de la especificidad de los procesos de fusión de membranas (53). El contacto inicial entre las membranas se realiza mediante complejos multiproteicos de gran tamaño localizados en la membrana celular y que reciben el nombre de exocisto. En los mamíferos, el exocisto (también conocido como el complejo Sec/8) está formado por 8 proteínas: sec3p, sec5p, sec6p, sec8p, sec10p, sec15p, exo70p y exo84p (54, 55). Se han demostrado interacciones directas entre muchas de ellas y con las membranas vesicular y plasmática (56). Exo70p parece ser la proteína proximal a la membrana celular mientras que el complejo entraría en contacto con la membrana vesicular a través de sec5p. En esta última membrana se ha identificado a Ra1, una proteína G de pequeño tamaño que vía sec5p conectaría la membrana vesicular con el exocisto (57). Existen dos isoformas de Ra1, Ra1A y Ra1B, siendo la primera la que presenta una ma-

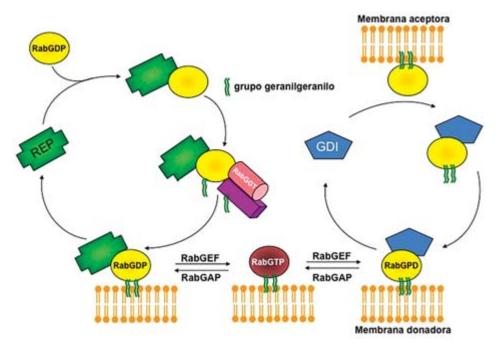


FIGURA 5. El ciclo de la GTPasas de la familia Rab. RabGDP: proteína Rab unida a GDP; RabGTP: proteína Rab unida a GTP; RabGGT: geranilgeraniltransferasa de proteínas Rab; REP: proteína acompañante de Rab; GDI: inhibidor de la disociación de GDP de la proteína Rab; RabGEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina; RabGAP: proteína activadora de la GTPasa. Véase el texto para obtener una explicación detallada.

yor abundancia en el cerebro. La interacción entre Ra1A y sec5p parece también ser necesaria para el ensamblaje del exocisto, que vendría a actuar como un efector de Ra1A (58). El exocisto resulta necesario para el reclutamiento de las vesículas hacia los lugares de exocitosis en las terminaciones de las neuronas maduras (59), y parece también jugar un papel en el crecimiento de las neuritas y la sinaptogénesis en las neuronas en desarrollo al especificar las regiones de la membrana plasmática en la que se producirá la exocitosis (60). Conviene señalar, no obstante, que el exocisto sería responsable de la fase inicial del anclaje vesicular mientras que otras proteínas como piccolo, bassoon y RIM intervendrían en las fases posteriores de este proceso.

LA NEUROEXOCITOSIS

Las vesícula sinápticas y las SNARES neuronales

Como se indicó en la Introducción, la neuroexocitosis presenta características únicas entre los procesos de fusión de membranas. En particular, destaca por una estrecha regulación en el tiempo —extraordinaria rapidez— y en el espacio —sólo ocurre en las zonas activas de las terminaciones nerviosas— y la notable capacidad de adaptarse —plasticidad— en función de la actividad sináptica. Estas propiedades especiales justifican las existencia de elementos proteicos específicos en la maquinaria de fusión así como de proteínas reguladoras que dotan a la neuroexocitosis de niveles de control propios.

La vesícula sináptica es la organela membranosa mejor conocida desde el punto de vista bioquímico y biofísico y la única de la que se dispone de un modelo a escala atómica (61). Su extraordinaria abundancia en el tejido cerebral—si cada vesícula se contabilizara como una sola molécula, la concentración de vesículas en el cerebro estaría en el rango micromolar— y el hecho presentar un tamaño bastante uniforme, permitió en los años setenta del pasado siglo el desarrollo de protocolos de centrifugación diferencial para su aislamiento y purificación (62). Más recientemente, la aplicación de técnicas de espectroscopía de correlación de fluoresencia, espectometría de masas, cristalografía de rayos X y modelización molecular ha permitido identificar el conjunto de las proteínas asociadas a las vesículas sinápticas, determinar el número de copias de cada una ellas por vesícula (Tabla I y II) e, incluso, elaborar un modelo tridimensional de esta organela (60, 62). A día de hoy, se han detectado 400 proteínas distintas asociadas a las vesículas sinápticas de las que aproximadamente 40 se consideran residentes en las mismas, si bien apenas 6 de ellas (sinaptofisina, si-

naptobrevina 2, el transportador de glutamato —VGLUT 1 o 2— sinaptotagmina 1, sinapsina 1 y Rab3A) dan cuenta del 40% del contenido proteico (17.1 ± 0.19 x 10⁻¹⁸ g/vesícula) de las vesículas (Tabla II). A partir del peso molecular, el número de Avogradro y el contenido proteico medio de las vesículas, es posible estimar, como promedio, el número de moléculas de cada proteína presente en una vesícula. De acuerdo con estos cálculos, una vesícula sináptica típica contendría 70 moléculas de sinaptobrevina 2, 30 de sinaptofisina, entre 9 y 14 del transportador de glutamato, 10 de Rab3A, 8 de sinapsina y 15 de sinaptotagmina 1. Ello implica que una vesícula sináptica dispondría de un elevado numero de copias de las proteínas que actualmente se consideran esenciales tanto para la exocitosis como para el transporte del neurotransmisor. La única excepción a esta regla sería la bomba de protones vesicular, responsable de crear el gradiente electroquímico de protones necesario para el almacenamiento del neurotransmisor, de la que habría un único ejemplar por vesícula. Conviene señalar que este peculiar reparto proteico posibilitaría la utilización repetida de las vesículas en procesos de fusión consecutivos sin que se garantizase la carga del transmisor (vesículas silentes). Otra característica llamativa de las vesículas sinápticas es su alto contenido relativo de proteínas (Tabla I). Las proteínas son responsables de aproximadamente dos tercios de la masa de las vesículas y ocuparían el 20% de su superficie. Entre los lípidos vesiculares destacan los fosfolípidos (7000 moléculas por vesícula) y el colesterol (5000 moléculas por vesícula). Si consideramos que en cada vesícula existirían 600 dominios proteicos transmembrana y que cada uno de ellos se encontrase rodeado por un anillo de fosfolípidos, cabe concluir que la mayoría de los fosfolípidos no se halla en forma libre, lo que determinaría que la membrana vesicular presentase una rigidez mayor que la del resto de las organelas membranosas.

La exocitosis de las vesículas sinápticas requiere de tres proteínas SNARE neuronales: sintaxina 1A —Qa— y SNAP-25 —Qbc—, presentes en la membrana plasmática, y la sinaptobrevina 2 —R— o VAMP 2 («vesicle-associated membrane protein»), una proteína integral de la membrana vesicular (38, 64, 65). La sintaxina 1A está formada por 288 aminoácidos (las cifras corresponden a las proteínas de la rata) y contiene un motivo SNARE flanqueado por un dominio aminoterminal complejo y un único dominio transmembrana en el extremo carboxilo. El domino aminoterminal está formado por tres hélices alfa ordenadas de forma antiparalela y conectadas al motivo SNARE por una región extensa y dotada de elevada flexibilidad. Esta circunstancia permite que el domino aminoterminal pueda interactuar con el motivo SNARE y dar lugar a la conformación cerrada de la sintaxina. La sinaptobrevina 2 es una proteína de solo 118 aminoácidos que, al igual que la sintaxina 1, posee un único dominio

Tabla I. Parámetros físicos y composición de las vesículas sinápticas		
Densidad (g/ml)	1.10	
Diametro externo (nm)	41.6	
Volumen acuoso interno (I)	19.86 x 10 ⁻²¹	
Nº de moléculas de neurotransmisor (a una concentración de 150 mM)	1790	
Masa (g)	29.6 x 10 ⁻¹⁸	
Proteína: Fosfolípidos (p:p)	1.94	
Fosfolípidos: Colesterol (mol:mol)	1:0.8	
Dominios trasmembrana (nº/% de superficie vesicular)	600/20	

transmembrana en posición carboxiloterminal al motivo SNARE. A diferencia de la sintaxina 1, la sinaptobrevina 2 carece prácticamente de domino aminoterminal. Por su parte, SNAP-25 posee 208 aminoácidos, contiene dos motivos SNARE unidos por una región flexible y carece de dominio transmembrana. La región conectora de los dos motivos SNARE alberga 4 cisteínas palmitoiladas mediante las que la proteína se ancla a la membrana plasmática.

La existencia en las neuronas de componentes proteicos específicos de la maquinaria de fusión determina que se produzcan mecanismos o interacciones moleculares particulares. Así, la secuencia de ensamblaje del complejo SNARE en estas células diferiría del propuesto con carácter general, ya que SNAP-25 y la sinaptobrevina 2 se asociarían en la membrana neuronal antes unirse a la sintaxina (18, 66). Otro ejemplo de interacción proteica característica de la neuro-exocitosis —y también de la exocitosis regulada en las células neuroendocrinas— está protagonizado por la tomosina (67). La tomosina es una proteína soluble de 130 kDa con un motivo SNARE R en posición carboxilo terminal que le permitiría sustituir a la sinaptobrevina en el complejo de fusión. En consecuencia, la tomosina podría inhibir la maduración vesicular compitiendo con la sinaptobrevina 2 durante el ensamblaje del complejo de fusión (68, 69). Por otra parte, las toxinas clostridiales (tetánica y botulínicas A, B, C1, D, E, F y G) son proteasas que actúan específicamente sobre las proteínas SNARE neuronales e inhiben la exocitosis de neurotransmisores al interferir con la forma-

Tabla II. Composición proteica de las vesiculas sinápticas.		
	% proteinas totales	Nº de copias/ vesícula
Sinaptofisina	10.20 ± 1.54	31.5
Sinaptobrevina 2	8.60 ± 1.55	69.8
Sintaxina 1	2.00 ± 0.27	6.2
SNAP-25	0.40 ± 0.06	1.8
Sinapsina	6	8.3
Rab3A	2.5	10.3
Sinaptotagmina 1	7	15.2
Sinaptogirina 1	0.5	2.0
SV2	1.4	1.7
SCAMP	0.3	0.8
CSP	0.6	2.8
VGLUT1	5.36 ± 1.11	9.0
VGLUT2	9.01 ± 2.31	14.4
Subunidad V-ATPasa V1-B	1.15 ± 0.21	1.4

ción del complejo de fusión (Figura 2B) (70). En el marco del modelo en tres etapas de la exocitosis expuesto en la Introducción, las toxinas clostridiales impedirían la adquisición de competencia secretora («priming») sin afectar el anclaje de las vesículas a la membrana plasmática («docking») o el proceso de fusión de membranas, ya que, una vez formados, los complejos SNARE son resistentes a la acción de las toxinas.

La sinaptogamina: el sensor de calcio de la neuroexocitosis

Las sinaptotagminas forman una pequeña familia —se han identificado 16 miembros en los vertebrados— de proteínas integrales de membrana que se expresan en neuronas y células neuroendocrinas. En el extremo amino se sitúa el dominio transmembrana que se encuentra unido mediante una región

conectora de longitud variable a dos dominios C2 («conserved region-2», C), denominados C2A y C2B, capaces de interactuar con los fosfolípidos de la membrana celular de forma dependiente de calcio. De hecho, los dominios C2A y C2B pueden combinarse con 3 y 2 iones calcio, respectivamente. Las sinaptotagminas se encuentran tanto en la membrana vesicular (isoformas 1, 2 y 9) como en la plasmática (isoformas 3 y 7) (71). Entre todas ellas, las sinaptotagminas 1 y 2 son las más la firmes candidatas a actuar como sensor(es) de calcio en la neuroexocitosis (72). Es de destacar que la afinidad por el calcio de algunas de las isoformas presentes en la membrana plasmática es diez veces mayor que la de las sinaptotagminas 1 y 2. Este hecho junto con el hallazgo de que la sinaptotagmina 7 actúa como sensor de calcio en la exocitosis de las células cromafines de la médula adrenal pero no en la neuronal (73) ha llevado a proponer que las sinaptotagminas con baja afinidad por el calcio (1 y 2) mediarían la exocitósis rápida —la inmediatamente acoplada a la entrada de calcio— de neurotransmisores en las neuronas mientras que las sinaptotagminas asociadas a la membrana plasmática actuarían en la exocitosis de las células neuroendocrinas. Son múltiples las evidencias que apoyan el papel de la sinaptotagmina 1 como nexo esencial entre la entrada de calcio durante los potenciales de acción y la fusión membranas. Entre ellas, sobresalen las que relacionan la eliminación del gen de la sinaptotagmina 1 de ratón con la desaparición de la fase rápida de la liberación de neurotransmisores, y la expresión de variantes de la proteína con distinta afinidad por el calcio con cambios en paralelo en la dependencia de calcio de la neurosecreción. Así mismo, se ha observado que la unión al calcio induce la incorporación de los dominios C2 de la sinaptotagmina a la membrana plasmática con una cinética compatible con la de la exocitosis regulada en las neuronas (74). La sinaptotagmina interactúa también con proteínas como la sintaxina 1, SNAP-25, el complejo SNARE, RIM, SV2 o los canales de calcio de tipo N. La interacción con el complejo SNARE resulta particularmente relevante ya que ha facilitado una explicación mecanística de la actuación de la sinaptotagmina en la fusión de membranas regulada por calcio (Figura 4). Así, se ha postulado que la sinaptotagmina contribuiría a estabilizar los complejos SNARE trans impidiendo la fusión espontánea de las membranas, mientras que la entrada de calcio promovería tanto la incorporación de la sinaptotagmina a la membrana plasmática como el desplazamiento de la complexina de la superficie del complejo SNARE trans, posibilitando la exocitosis (75, 76).

Complexinas

Las complexinas son cuatro proteínas citosólicas con expresión específica en el cerebro y capacidad para unirse a los complejos SNARE (77). Existe un amplio acuerdo en que las complexinas regulan la fusión de membranas dependiente de calcio en etapa posteriores a la maduración vesicular, si bien su mecanismo de acción es todavía objeto de controversia. La hipótesis que cuenta con mayor refrendo experimental es la de que las complexinas se unen al complejo SNARE *trans* estabilizándolo en un estado metaestable. El aumento del calcio intracelular permitiría a la sinaptotagmina 1 desplazar a la complexina del complejo y, así, disparar la exocitosis (Figura 4) (78, 79).

Munc13

Mediante el proceso conocido como maduración («priming») las vesículas adquieren competencia secretora pasando a integrar el llamado contingente de vesículas disponibles («release-ready») para ser liberadas (3). Las respuestas sinápticas dependen, por tanto, del tamaño de dicho contingente y de la probabilidad que cada vesícula integrante del mismo tiene de ser liberada. En apartados previos de este trabajo hemos relacionado la maduración vesicular con el ensamblaje del complejo SNARE, un proceso regulado no solo por la disponibilidad de monómeros de SNA-REs sino también por proteínas como Munc18 y, en el caso de la neuroexocitosis, por Munc13 (Figura 4) (80). Bajo la denominación de Munc13 se engloban tres proteínas distintas, Munc13-1, Munc13-2 y Munc13-3, que se localizan en las zonas activas y muestran una expresión diferencial en distintas regiones del cerebro (81). Así, Munc13-1 se concentra en las sinapsis glutamatérgicas, Munc13-1 y Munc13-2 son las formas predominantes en las sinapsis gabérgicas, mientras que Munc13-3 sería la isoforma específica del cerebelo. Todas las isoformas contienen un dominio de unión al diacilglicerol, lo que les permite mediar el efecto modulador de la liberación de neurotransmisores ejercido por los ésteres de forbol y muchos otros compuestos incluyendo una gran variedad de neurotransmisores— que se sirven de proteínas G heteroméricas y del diacilglicerol en sus vías de señalización celular (82). Tanto estos compuestos como la propia actividad neuronal estimularían a Munc13 a promover la maduración vesicular con el consiguiente aumento del contingente de vesículas disponibles para ser liberadas (83). Es de destacar que Munc13 está implicada en formas de plasticidad sináptica rápidas como la «augmentation» mediante la cual las neuronas modifican la liberación de neurotransmisores en función de la frecuencia de descarga de potenciales de acción (84). Munc13 es capaz de interactuar con el extremo amino de la sintaxina 1 y también con Munc18, con la que competiría por unirse a la primera (85). Estos datos sugieren que Munc13 promovería la maduración vesicular favoreciendo un cambio de la sintaxina 1 desde la configuración cerrada a la abierta, de manera que pueda participar en la formación del complejo SNA-RE. No obstante, en la actualidad todavía no puede descartarse que otras interacciones de Munc13 con proteínas como la calmodulina o RIM puedan también mediar las acciones sinápticas de Munc13 (Figura 4) (86, 87).

RIM

RIM —más propiamente conocida como RIM1 para diferenciarla de RIM2, que es una proteína similar presente en el cerebro y las glándulas endocrinas de los mamíferos— es una proteína de la zona activa de las terminaciones nerviosas que interactúa específicamente con la forma de Rab3A unida a GTP y con Munc13-1 (no así, con Munc13-2) (86, 88). Conviene señalar, además, que Rab3A y Munc13-1 se unen al mismo sitio de RIM y que estas asociaciones son mutuamente excluyentes (86). La interacción de RIM con ambas proteínas permite plantear la hipótesis de que RIM podría coordinar el atraque y la maduración de las vesículas mediante el reconocimiento de Rab3A presente en la membrana vesicular y que la hidrólisis del GTP permitiría activar la maduración vesicular mediante la subsiguiente interacción con Munc13 (Figura 4). Esta hipótesis alcanza verosimilitud a partir de la datos obtenidos en neuronas procedentes de ratones deficientes en el gen que codifica RIM y que indican una disminución del contingente de vesículas disponibles para ser liberadas así como la pérdida de distintas formas de plasticidad sináptica rápida (facilitación y depresión por pulsos pareados, potenciación postsináptica, etc.) (89). Debe mencionarse también que RIM puede interactuar con muchas otras proteínas como SNAP-25 (90), sinaptotagmina, canales de calcio, RIM-BPs («RIM binding proteins»), cAMP-GEFII y las liprinas. Las RIM-BPs son proteínas que se unen a RIM y que también se asocian a los canales de calcio (91); cAMP-GEFII, también conocido como Epac, es un proteína de unión a AMPc que parece mediar algunos de los efectos de ese nucleótido sobre la exocitosis (92); las liprinas son una familia de proteínas necesaria para la formación de la zonas activas durante la sinaptogénesis y que podrían mediar el anclaje de RIM a las zonas activas (93). En conjunto, todas estas interacciones sugieren que RIM pudiera actuar como organizador del esqueleto proteico de las zonas activas y, en consecuencia, coordinar los procesos de anclaje, maduración y exocitosis de las vesículas sinápticas al objeto de posibilitar la rapidez y seguridad características de la transmisión sináptica.

TRÁFICO DE MEMBRANAS Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

La práctica totalidad de las funciones vitales depende de la correcta distribución de las proteínas a destinos celulares específicos. Tradicionalmente se ha considerado que las alteraciones en la localización subcelular de las proteínas y las manifestaciones clínicas asociadas eran primariamente debidas a mutaciones que afectaban a la estructura y plegamiento de las proteínas o a su procesamiento postraduccional —p. ej. glicosilación— con la consiguiente alteración en su transporte. Más recientemente, se ha tomado conciencia de que mutaciones en los genes directamente implicados en el tráfico de membranas pueden ser también responsables de anomalías en la localización de las proteínas (94). En la actualidad se han descrito más de un treintena de enfermedades hereditarias relacionadas con alteraciones en el tráfico de membranas y vinculadas a defectos en la biogénesis de las vesículas, las proteínas Rab y otras GTPasas, las proteínas del citoesqueleto, el atraque vesicular o la fusión de membranas (95). Aunque los fenotipos observados en los pacientes son muy diversos, frecuentemente incluyen hipopigmentación, alteraciones en la respuesta inmune de base celular y anomalías neurológicas. Se trata de enfermedades de muy baja incidencia (enfermedades raras), lo que no debe ser obstáculo para su estudio ya que, como veremos más adelante, su mejor conocimiento reportará un beneficio no sólo a los pacientes afectados de ellas sino también a los que padecen enfermedades de carácter multifactorial y considerable prevalencia en la población. La revisión de todos estas enfermedades o síndromes queda fuera de los objetivos de este trabajo, por lo que nos limitaremos a reseñar aquellas en la que se han identificado alteraciones en las proteínas Rab o en los procesos de atraque vesicular y fusión de membranas, y que cursan con manifestaciones neurológicas.

Alteraciones de las proteínas Rab

La importancia de las proteínas Rab en el desarrollo cerebral ha sido puesta de manifiesto tras la observación de enfermedades tanto humanas como animales debidas a la mutación de los genes relacionados con Rab23 y Rab3A.

Rab23 se localiza en los endosomas tempranos, organelas encargadas del reciclaje de las membrans vesiculares tras la endocitosis, y se expresa abundantemente en el cerebro y médula espinal de embriones de ratón durante la segunda mitad de la gestación. Esta proteína parece estar implicada en las alte-

raciones —falta de cierre del tubo neural, polidactilia, insuficiente derarrollo ocular— que se registran en ratones con defectos en la vía de señalización del gen «hedgehog» (96).

Como ya se ha mencionado, Rab3A es la proteína Rab con mayor expresión en el sistema nervioso. Se han descrito alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso ligadas a mutaciones en dos genes implicados en la regulación de Rab3A: el gen que codifica RabGDI (Figura 5), cuya mutación da lugar a retraso mental, y el gen que codifica RabGAP, cuyas alteraciones se traducen en la aparición de los síndromes de Warburg y de Martsolf (97, 98). El síndrome de Warburg es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la existencia de microftalmia, cataratas, microcefalia y microgenitalia. Los pacientes afectos del síndrome de Martsolf presentan un fenotipo similar a los de Warburg, si bien más leve. RabGAP cataliza la conversión de Rab3AGTP en Rab3AGDP y, por tanto, podría determinar el ritmo de disociación de Rab3A de las vesículas sinápticas. A tenor de las alteraciones en la liberación exocitósica de glutamato detectadas en ratones KO para el gen de RabGAP, se ha hipotetizado que los defectos cerebrales y genitales propios de estos síndromes serían debidos a una secreción anormal por el eje hipotálamo-hipofisario de neurotransmisores y hormonas con efectos moduladores del desarrollo de dichos órganos (99).

Alteraciones del atraque vesicular y de la fusión de membranas

Las proteínas SNARE son mediadores generales de los procesos fusión de membranas. Ello determina que desempeñen un papel esencial en la biología celular, por lo que son muy escasas las enfermedades en las que se han identificado mutaciones en los genes que codifican proteínas SNARE. Solo dos enfermedades humanas, la linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (retraso psicomotor, pancitopenia, alteraciones de la coagulación, fallo hepático, etc.) y el síndrome CEDNIK (disgenesia cerebral, neuropatía, ictiosis y queratodermia palmoplantar) se han relacionado con mutaciones en proteínas SNARE, respectivamente la sintaxina 11 y SANAP29, que participarían en el tráfico intracelular de membranas (100, 101). Esta escasez de cuadros clínicos se vuelve ausencia casi absoluta cuando se consideran las SNAREs implicadas en la exocitosis, ya que solo muy recientemente se ha descrito la existencia de un ratón con una mutación espontánea del gen de SNAP25 que lograra la supervivencia necesaria para poder ser estudiado (102). Este animal presenta ataxia y alteraciones sensorimotoras, que se han relacionado con una reducción de la exocitosis y de la amplitud de los potenciales corticales postsinápticos excitatorios.

Las SNAREs también podrían intervenir en la fisiopatología, servir como marcadores o dar pie a nuevas estrategias terapéuticas de algunas enfermedades neurodegenerativas. Es el caso de la sintaxina 5, que interactúa específicamente con la presenilina 1, una de las una enzimas encargadas de procesar la proteína precursora de la beta amiloide. Curiosamente, una variante de la presenilina 1, la ∂E9, que caracteriza a determinados sujetos afectos de formas familiares de la enfermedad de Alzheimer, presenta una menor capacidad de unión a la sintaxina 5. Además, la sobreexpresión de la sintaxina 5 en células NG108-15 determina una menor secreción del péptido beta amiloide, lo que confirmaría la participación de esta SNARE en la fisiopatología de ciertos tipos de la enfermedad de Alzheimer de carácter familiar (103). Otro ejemplo de la participación de proteínas SNARE en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas vendría dado por la enfermedad de Parkinson familiar, en la que han sido implicadas diversas mutaciones del gen de la alfa-sinucleína. La alfa-sinucleína es el principal constituyente de los cuerpos de Lewy, que caracterizan histopalógicamente la enfermedad de Parkinson. El mecanismo por el que dicha proteína podría inducir la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriada, que subyace a la sintomatología de la enfermedad, es todavía desconocido. Resultados recientes indican que la sobreexpresión de la alfa-sinucleína inhibe el tráfico de membranas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi y que, además, podría afectar al adecuado plegamiento de las SNA-REs neuronales. Más relevante, por su potencial interés terapéutico, es la observación de que la sobreexpresión de Rab1 consigue revertir el daño neuronal en modelos animales de la enfermedad de Parkinson (104). Finalmente, cabe apuntar también que diversos polimorfismos en el gen de SNAP-25 han sido relacionados con la susceptibilidad para padecer el trastorno de hiperactividad y déficit de atención (105), y que se ha detectado una disminución de dicha SNA-RE en la corteza frontal de sujetos fallecidos de la enfermedad de Huntington. Hay que destacar que se trata de una disminución selectiva de SNAP-25 y rabfilina 3A, sin que se haya observado en el caso de la sinaptobrevina 2, la sintaxina 1, rab3A o la sinaptofisina (106). Este hallazgo podría contribuir a explicar algunos de los síntomas de la enfermedad de Huntington al tiempo que abre una línea de investigación orientada a la identificación de marcadores biológicos de la progresión de la enfermedad.

No nos resistimos a hacer una consideración final sobre la evolución del interés médico de la maquinaria exocitótica y, más concretamente, de las proteínas SNARE. Las proteínas SNARE han servido como dianas moleculares de las toxinas tetánica y botulínicas mucho antes de que se conociera su existencia. Una vez descubiertas y constatado su papel de sustratos de dichas to-

xinas, pudo asignárseles una función esencial en la exocitosis de neurotransmisores. Más recientemente, se han vinculado con la etiología y la fisiopatología de diversas enfermedades en el ámbito neurológico. Por eso, nos parece previsible que, a medio plazo, puedan servir como herramientas en el diagnóstico o para el desarrollo de terapias génicas útiles en el manejo de algunas de esas enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Diego Bustillo Merino es becario predoctoral del Gobierno Vasco; la Dra. Yolanda Gutiérrez Martín es investigadora contratada con cargo al consorcio NEUROTRANS-CM de la Comunidad de Madrid. Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Ministerio de Investigación Científica e Innovación (BFU2005-06034) y de la Comunidad de Madrid (S2006/SAL-02453).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Jahn, R. y Scheller, R.J. (2006) SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 631-643.
- (2) Südhof, T.C. (2000) The synaptic vesicle cycle revisited. Neuron 28: 317-320.
- (3) ARTALEJO, A.R. (2005). La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 127-151.
- (4) BOCK, J.B.; MATERN, H.T.; PEDEN, A.A. Y SCHELLER, R.H. (2001) A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*. 409: 839-841.
- (5) Brunger, A.T. (2005) Structure and function of SNARE and SANARE-interacting proteins. *Q. Rev. Biophys.* 38: 1-47.
- (6) SUTTON, R.B.; FASSHAUER, D.; JAHN, R. Y BRUNGER, A.T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 395: 347-353.
- (7) Fasshauer, D. (2003) Structural insights into the SNARE mechanisms. *Biochim. Biohys. Acta.* 1641: 87-97.
- (8) Fasshauer, D.; Sutton, R.B.; Brunger, A.T. y Jahn, R. (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q-and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 15781-15786.
- (9) Hong, W. (2005) SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* 1744: 493-517.

- (10) CALAKOS, N.; BENNETT, M.K.; PETERSON, K.E. Y SCHELLER, R.H. (1994) Protein-protein interactions contributing to specificity of intracellular vesicle trafficking. *Science*. 263: 1146-1149.
- (11) DULUBOVA, I.; SUGITA, S.; HILL, S. ET AL. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of mucn18. *EMBO J.* 18: 4372-4382.
- (12) Fiebig, K.; Rice, L.M.; Pollock, E. y Brunger, A.T. (1999) Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nature Struct. Biol.* 6: 117-123.
- (13) FASSHAUER, D. Y MARGITTAI, M.A. (2004) A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *J. Biol. Chem.* 279: 7613-7621.
- (14) Lang, T. (2007) SNAREs and membrane rafts. J. Physiol. 585: 693-698.
- (15) Chamberlain, L.H.; Burgoyne, R.D. y Gould, G.W. (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts. In PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 5619-5624.
- (16) Hanson, P.I.; Roth, R.; Morisaki, H. et al. (1997) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-free-ze/deep-etch electrón microscopy. *Cell.* 90: 523:-535.
- (17) Lin, R.C. y Scheller, R.H. (1997) Structural organization of synaptic exocytosis core complex. *Neuron*. 19: 1087-1094.
- (18) CHEN, Y.A.; SCALES, S.J. Y SCHELLER, R.H. (2001) Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. *Neuron*. 30: 161-170.
- (19) SORENSEN, J.B. (2003) Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of vesicles. *Pflügers Arch.* 448: 347-362.
- (20) SÖLLNER, T.; BENNETT, M.K.; WHITEHEART, S.M. ET AL. (1993) A protein assembly disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 75: 409-418.
- (21) Hanson, P.I. y Whiteheart, S.W. (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 519-529.
- (22) MARZ, K.E.; LAUER, J.M. Y HANSON, P.I. (2003) Defining the SNARE complex binding surface of ?-SNAP: implications for SNARE complex dissasembly. *J. Biol. Chem.* 278: 27000-27008.
- (23) McMahon, H.T. y Südhof, T.C. (1995) Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 forms high affinity ?-SNAP binding site. *J. Biol. Chem.* 270: 2213-2217.
- (24) HALACHMI, N. Y LEV, Z. (1996) The Sec family. A novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion. *J. Neurochem.* 66: 889-897.

- (25) TOONEN, R.F. Y VERHAGE, M. (2003) Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol.* 13: 177-186.
- (26) DULUBOVA, I.; KHVOTCHEV, M.; LIU, S. ET AL. (2007) Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 2697-2702.
- (27) ZILLY, F.E.; SORENSEN, J.B.; JAHN, R. Y LANG, T. (2006) Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. *PloS Biol.* 4: e330.
- (28) OKAMOTO, M. Y SÜDHOF, T.C. (1997) Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* 272: 31459-31464.
- (29) GALLWITZ, D. Y JAHN, R. (2003) The riddle of Sec1/Munc-18 proteins —new twists added to their interactions with SNAREs. *Trends Biochem. Sci.* 28: 113-116.
- (30) Rizo, J. y Südhof, T.C. (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 641-653.
- (31) SCHÜTZ, D.; ZILLY, F.; LANG, T. ET AL. (2005). A dual function for Munc-18 in exocytosis of PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* 21: 2419-2432.
- (32) VOETS, T.; TOONEN, R.F.; BRIAN, E.C. ET AL. (2001) Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron*. 31: 581-589.
- (33) FISHER, R.J.; PEVSNER, J. Y BURGOYNE, R.D. (2001) Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc 18. *Science*. 291: 875-878.
- (34) SCHULTZ, J.; DOERKS, T.; PONTING, C.P. ET AL. (2000) More than 1,0000 putative new human signalling proteins revealed by EST data mining. *Nat. Genet.* 25: 201-204.
- (35) ZERIAL, M. Y McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 107-117.
- (36) PFEFFER, S. Y ALVAZIAN, D. (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 886-896.
- (37) FISHER VON MOLLARD, G.; MIGNERY, G.A.; BAUMERT, M. ET AL. (1990) rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 1988-1992.
- (38) Südhof, T.C. (2004) The synaptic vesicle cycle. Annu. Rev. Neurosci. 27: 509-547.
- (39) Segev, N. (2001) Ypt and Rab GTPases: insights into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 500-511.
- (40) SCHLÜTER, O.M.; SCHMITZ, F.; JAHN, R. ET AL. (2003) A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J. Neurosci.* 24: 6629-6637.

- (41) LEENDERS, A.G.; LOPES DA SILVA, F.H.; GHIJEN, W.E. Y VERHAGE, M. (2001) Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Mol. Biol. Cell.* 12: 3095-3102.
- (42) GEPPERT, M.; GODA, Y.; STEVENS, C.F. Y SÜDHOF, T.C. (1997) The samll GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature*. 387: 810-814.
- (43) Doussau, F.; Clabeco, A.; Henry, J.P. et al. (1998) Calcium-dependent regulation of rab3 in short-term plasticity. *J. Neurosci.* 18: 3147-3157.
- (44) COPPOLA, T.; HIRLING, H.; PERRET-MENOUD, V. ET AL. (2001) Rabphilin dissociated from Rab3 promotes endocytosis through interaction with Babaptin-5. *J. Cell Sci.* 114: 243-255.
- (45) Burns, M.E.; Sasaki, T.; Takai, Y. y Augustine, G.J. (1998) Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic traffic. *J. Gen. Physiol.* 111: 243-255.
- (46) HAYNES, L.P.; EVANS, G.J.; MORGAN, A. Y BURGOYNE, R.D. (2001) A direct inhibitory role for Rab3-specific effector, Noc2, in Ca²⁺-regulated exocytosis in neuro-endocrine cells. *J. Biol. Chem.* 276: 9726-9732.
- (47) Martincic, I.; Peralta, M.E. y Ngsee, J.K. (1997) Isolation and characterization of a dual Rab and VAMP2 receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 26991-26998.
- (48) FIGUEROA, C.; TAYLOR, J. Y VOJTEK, A.B. (2001) Prenilated Rab acceptor protein is a receptor or prenylated small GTPases. *J. Biol. Chem.* 276: 28219-28225.
- (49) GOUGEON, P.Y.; PROSSER, D.C., DA-SILVA, L.F. Y NGSEE, J.K. (2002) Disruption of Golgi morphology and trafficking in cells expressing mutant prenylated Rab acceptor-1. *J. Biol. Chem.* 277: 36408-36414.
- (50) FENSTER, S.D.; CHUNG, W.J.; ZHAI, R. ET AL. (2000) Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron*. 25: 203-214.
- (51) PARK, J.B.; FARNSWORTH, C.C. Y GLOMSET, J.A. (1997) Ca^{2+/}calmodulin causes Rab3A to dissociate from synaptic membranes. *J. Biol. Chem.* 272: 20857-20865.
- (52) COPPOLA, T.; PERRET-MENOUD, V.; LUTHI, S. ET AL. (1999) Disruption of Rab3-cal-moudulin interaction, but not other effector interactions, prevents Rab3 inhibition of exocytosis. *EMBO J.* 18: 5885-5891.
- (53) PFEFFER, S.R. (1999) Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* 1:E17-E22.
- (54) HSU, S.C.; TING, A.E.; HAZUKA, C.D. ET AL. (1996) The mammalian brain rsec/8 complex. *Neuron*. 17: 1209-1219.
- (55) Hsu, S.C.; Hazuka, C.D.; Foletti, D. y Scheller, R.H. (1999) Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol.* 9: 150-153.

- (56) MATERN, H.T.; YEAMAN, C.; NELSON, W.J. Y SCHELLER, R.H. (2001) The Sec6/8 complex in mammalian cells: characterization of mammalian Sec3, subunit interactions, and expression of subunits in polarized cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 9648-9653.
- (57) BRYMORA, A.; VALOVA, V.A.; LARSEN, M.R. ET AL. (2001) The brain exocyst complex interacts with Ra1A in a GTP-dependent manner: identification of a novel mammalian Sec3 gene and a second Sec15 gene. *J. Biol. Chem.* 276: 29792-29797.
- (58) Moskalenko, S.; Henry, D.O.; Rosse, C. et al. (2002) The exocyst is a Ra1 effector complex. *Nat. Cell Biol.* 4: 66-72.
- (59) POLZIN, A.; SHIPITSIN, M.; GOI, T. ET AL. (2001) Ra1-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Mol. Cell. Biol.* 22: 1714-1722.
- (60) HAZUKA, C.D.; FOLETTI, D.L.; HSU, S. ET AL. (1999) The Sec/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *J. Neurosci.* 21:3839-3848.
- (61) TAKAMORI, S.; HOLT, M.; STENIUS, K. ET AL. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell.* 127: 831-846.
- (62) NAGY, A.; BAKER, R.R.; MORRIS, S.J. Y WHITTAKER, V.P. (1976) The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. *Brain Res.* 109: 285-309.
- (63) Burré, J. y Volknandt, W. (2007) The synaptic vesicle proteome. J. Neurochem. 101: 1448-1462.
- (64) TRIMBLE, W.S.; COWAN, D.M. Y SCHELLER, R.H. (1988) VAMP-1: a synaptic vesicle associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85, 4538-4542.
- (65) Bennet, M.K.; Calakos, N. y Scheller, R.H. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*. 257: 255-259.
- (66) AN, S.J. Y ALMERS, W. (2004) Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells. *Science*, 306: 1042-1046.
- (67) FUJITA, Y.; SHIRATAKI, H.; SAKISATA, T. ET AL. (1998) Tomosyn: a syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. *Neuron*. 20: 905-915.
- (68) Hatsuzawa, K.; Lang, T.; Bruns, D. et al. (2003) The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis. *J. Biol. Chem.* 278: *31159-31166*.
- (69) McEwen, J.M.; Madison, J.M.; Dybbs, M. y Kaplan, J.M. (2006) Antagonistic regulation of synaptic vesicle priming by Tomosyn and UNC-13. *Neuron*. 51: 303-315.

- (70) Schiavo, G.; Matteoli, M. y Montecucco, C. (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 80: 717-766.
- (71) Südhot, T.C. (2002) Synaptotagmins: why so many? J. Biol. Chem. 277: 7629-7632.
- (72) Chapman, E.R. (2002) Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 498-508.
- (73) SCHONN, J.S.; MAXIMOV, A.; LAO, Y. ET AL. (2008) Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca2+ sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 3998-4003.
- (74) Chapman, E.R. (2008) How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu. Rev. Biochem.* 77: 615-641.
- (75) RIZO, J.; CHEN, X. Y ARAC, D. (2006) Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotramsitter release. *Trends Cell. Biol.* 16: 339-50.
- (76) CHICKA, M.C.; HUI, E.; LIU, H. Y CHAPMAN, E.R. (2008) Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca2+. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 827-835.
- (77) Chen, X.; Tomchick, D.R.; Kovrigin, E. et al. (2002) Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron*. 33: 397-409.
- (78) REIM, K.; MANSOUR, M.; VAROQUEAUX, F. ET AL. (2001) Complexins regulate a late step in Ca²⁺-depdnedent neurotransmitter release. *Cell*. 104: 71-81.
- (79) TANG, J.; MAXIMOV, A.; SHIN, O.H. ET AL. (2006) A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*. 126: 1175-1187.
- (80) Brose, N.; Hofmann, H.; Kata, Y. y Südhof, T.C. (1998) Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define a novel family of C2-domain proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 25273-25280.
- (81) Augustin, I.; Rosenmund, C.; Südhof, T.C. y Brose, N. (1999) Differential expresión of two novel Munc13 proteins in rat brain. *Biochem. J.* 337: 363-371.
- (82) Betz, A.; Ashery, U.; Rickmann, M. et al. (1998) Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron*. 21: 123-136.
- (83) Ashery, U.; Varoqueaux, F.; Voets, T. et al. (2000) Munc13-1 acts as a priming factor for large-dense core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J*. 19: 3586-3596.
- (84) ROSENMUND, C.; SIGLER, A.; AUGUSTIN, I. ET AL. (2002) Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc 13 isoforms. *Neuron*. 33: 411-424.

- (85) SASSA, T.; HARADA, S.; OGAWA, H. ET AL. (1999) Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13. *J. Neurosci.* 19: 4772-4777.
- (86) Betz, A.; Thakur, P.; Junge, H. et al. (2001) Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron*. 30: 183-196.
- (87) Xu, X.Z.; Wess, P.D.; Chen, H. et al. (1998) Retinal targets for calmodulin include proteins implicated in synaptic transmisión. *J. Biol. Chem.* 273: 31297-31307.
- (88) WANG, Y.; OKAMOTO, M.; SCHMITZ, F. ET AL. (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*. 388: 593-598.
- (89) Schoch, S.; Castillo, P.E.; Jo, T. et al. (2002) RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature*. 415: 321-326.
- (90) COPPOLAA, T.; MAGNIN-LUTHI, S.; PERRET-MENOUD, V. ET AL. (2001) Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 276: 32756-32762.
- (91) Hibino, H.; Pironkova, R.; Onwumere, O. et al. (2002) RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltag gated Ca(2+) channels. *Neuron*. 34: 411-423.
- (92) OZAKI, N.; SHIBASAKI, T.; KASHIMA, Y. ET AL. (2000) cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 2: 805-811.
- (93) ZHEN, M. Y JIN, Y. (1999) The liprin protein SUD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in *C. elegans. Nature*. 401: 371-375.
- (94) OLKKONEN, V.M. Y IKONEN, E. (2000) Genetic defects of intracellular-membrane transport. *N. Eng. J. Med.* 343: 1059-1104.
- (95) GISSEN, P. Y MAHER, E.R. (2007) Cargos and genes: insights into vesicular transport from inherited human disease. *J. Med. Genet.* 44: 545-555.
- (96) EGGENSCHWILER, J.T.; ESPINOZA, E. Y ANDERSON, K.V. (2001) Rab23 is an essential negative regulator of the mouse sonic hedgebog signalling pathway. *Nature*. 412: 194-198.
- (97) ALIGIANIS, J.A.; JOHANSON, C.A.; GISSEN, P. ET AL. (2005) Mutation of the catalytic subunit of RAB3GAP causes Warburg micro syndrome. *Nat. Genet.* 37: 221-223.
- (98) ALIGIANIS, J.A.; MORGAN, N.V.; MIONE, M. ET AL. (2006) Mutation in Rab3 GTPase-activating protein (RAB3GAP) noncatalytic subunit in a kindred with Martsolf sindrome. *Am. J. Hum. Genet.* 78: 702-707.

- (99) SAKANE, A.; MANABE, S.; ISHIZAKI, H. ET AL. (2006) Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 10029-10034.
- (100) Spreacher, E.; Ishida-Yamamoto, A.; Mizrahi-Koren, M. et al. (2005) A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous síndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ictiosis and palmoplantar keratoderma. *Am. J. Hum. Genet.* 77: 242-251.
- (101) Zur Stadt, U.; Schmidt, S.; Kasper, B. et al. (2005) Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum. Mol. Genet.* 14: 827-834.
- (102) JEANS, A.F.; OLIVER, P.L.; JOHNSON, R. ET AL. (2007) A dominant mutation in Snap25 causes impaired vesicle trafficking, sensorimotor gating, and ataxia in the blind-drunk mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104: 2431-2436.
- (103) Suga, K.; Saito, A.; Tomiyama, T. et al. (2005) Syntaxin 5 interacts specifically with presentilin holoproteins and affects processing of betaAPP in neuronal cells. *J. Neurochem.* 94: 425-439.
- (104) Chua, C.E. y Tang, B.L. (2006) Alpha-synuclein and Parkinson's disease: the first roadblock. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 837-846.
- (105) Feng, Y.; Crosbie, J.; Wigg, K. et al. (2005) The SNAP25 gene as a susceptibility gene contributing to attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry*. 10: 998-1005.
- (106) SMITH, R.; KLEIN, P.; KOC-SCHMITZ, Y. ET AL. (2007) Loss of SNAP-25 and rabfillin 3A in sensory-motor cortex in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 103: 115-123.

4. Neurotransmisión mediada por nucleótidos: perspectivas terapéuticas en neurodegeneración y neuroprotección

MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL Y JAVIER GUALIX

RESUMEN

Los receptores de nucleótidos se clasifican en dos grandes familias, receptores ionotrópicos P2X y receptores metabotrópicos P2Y. Hasta la fecha se han descrito siete subtipos de receptores P2X (P2X1-P2X7) y ocho subtipos de receptores pertenecientes a la familia P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}). Ambas subclases de receptores se expresan de manera muy abundante en el SNC, donde están presentes tanto en neuronas como en células gliales. El ATP extracelular, mediante la activación de estos receptores P2X y P2Y, actúa como un neurotransmisor excitatorio rápido en diversas áreas del SNC, modula la liberación de neurotransmisores y la excitabilidad neuronal y regula la función de la glía. En la actualidad se acumulan evidencias sólidas de la implicación de diferentes subtipos de receptores P2X y P2Y en una amplia variedad de condiciones patológicas en el SNC. Este capítulo pretende hacer una revisión del papel neurotransmisor de los nucleótidos, así como de la implicación de la señalización nucleotídica en diferentes desórdenes del SNC, indicando los subtipos de receptores P2 específicos que podrían constituir potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de las diversas patologías.

Palabras clave: Receptores P2X. Receptores P2Y. Alzheimer. Parkinson. Huntington. Esclerosis lateral amiotrófica. Trauma cerebral. Hipoxia/isquemia.

ABSTRACT

Nucleotide-mediated neurotransmission: therapeutical perspectives in neurodegeneration and neuroprotection

Nucleotide receptors are classified in two main families: ionotropic P2X and metabotropic P2Y receptors. Currently, seven subtypes of P2X (P2X1-P2X7) and eight subtypes of P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}) receptors are known to exist. Both receptor subclasses are widely expressed in the CNS, being present in both neurons and glial cells. Extracellular ATP, acting on P2X and P2Y receptors, act as a fast neurotransmitter and modulator of the neurotransmitter release and neural excitability and also regulates the function of glial cells. Now, there is compelling evidence of the involvement of different subtypes of P2X and P2Y receptors in a variety of pathological conditions in the CNS. This chapter reviews the neurotransmitter role of nucleotide compounds and the involvement of nucleotidic signalling in CNS disorders, highlighting specific P2 receptor subtypes that might be therapeutically targeted for the treatment of these conditions.

Keywords: P2X receptors. P2Y receptors. Alzheimer's disease. Parkinson's disease. Huntington's disease. Amyotrophic lateral sclerosis. Cerebral trauma. Hypoxia/ischaemia.

LOS NUCLEÓTIDOS EN LA NEUROTRANSMISIÓN

El concepto de la transmisión purinérgica, o transmisión mediada por nucleótidos, comenzó a fraguarse a finales de los años 60 y principios de los 70 del siglo XX, a partir de una serie de estudios que mostraron como, tras la estimulación eléctrica de nervios periféricos, era posible detectar respuestas postsináp-

Abreviaturas: α , β -meATP, α , β -metilén-adenosina-5'-trifosfato; $A\beta$, péptido β -amiloide; A-438079, 3-(5-(2,3-diclorofenil)-1*H*-tetrazol-1-il)metil piridina; A-740003, [N-(1-{[(cianoimino)(5-quinolinilamino)metil]amino}-2,2-dimetilpropil)-2-(3,4-dimetoxifenil) acetamida]; **AKT**; proteína quinasa B (=PKB); AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; APP, proteína precursora del β-amiloide; AR-C69931MX, N⁶-(2-metiltioetil)-2-(3,3,3-trifluoropropiltio)-β, γ-diclorometilen-ATP (=cangrelor); ABC, ATP binding cassette; AMPc, adenosina-3',5'-monofosfato cíclico; ARNm, ácido ribonucleico mensajero; BBG, Brilliant blue G; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; BzATP, 3'-O-(4-benzoil)benzoil adenosina-5'trifosfato; [Ca²⁺]_i, concentración de calcio citosólico libre; CaMKII, proteína quinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina de tipo II; ELA, esclerosis lateral amiotrófica; GABA, ácido-γaminobutírico; GFP, proteína fluorescente verde; GIRK, canal de K⁺ rectificador con flujo de entrada ("inward rectifier") acoplado a proteínas G; GPCR, receptor acoplado a proteínas G; GSK-3, glucógeno sintasa quinasa de tipo 3; HEK, células embrionarias humanas de riñón; iGluR, receptor ionotrópico de glutamato; IFN-γ, interferón gamma; IP₃, inositol-1,4,5-trifosfato; $\mathbf{Ip}_{5}\mathbf{I}$, \mathbf{P}^{1} , \mathbf{P}^{5} -Di(inosina-5') pentafosfato; $\mathbf{KN-62}$, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinasulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina; MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógenos; MRS2179, 2'-deoxi-N⁶-metiladenosina-3',5'-bisfosfato; MRS2279, 2-cloro-N⁶-metil-(N)-metanocarba-2'-

ticas incluso en presencia de antagonistas colinérgicos y adrenérgicos. Ello permitió postular la existencia de nervios no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC). Más adelante se comprobaría que el neurotransmisor liberado por estos nervios NANC era el ATP (1). La demostración de que el ATP era coliberado junto con noradrenalina y acetilcolina de nervios simpáticos o parasimpáticos permitió poner en entredicho el principio de Dale que postulaba que cada célula nerviosa produce, almacena y libera un único tipo de transmisor (2). Más adelante, se obtuvieron las primeras evidencias directas de las acciones extracelulares del ATP en el sistema nervioso central (SNC), mediante el registro de corrientes de entrada tras la aplicación de ATP en una subpoblación de neuronas del asta dorsal de la médula espinal o en neuronas de diversos ganglios sensoriales (3). Posteriormente se propuso que el ATP estaba implicado en la transmisión de sensaciones propioceptivas y nociceptivas en la médula espinal (4) y que, además, mediaba corrientes postsinápticas excitatorias en cortes de la habénula medial (5), en el asta dorsal de la médula espinal (6) y en el hipocampo (7).

A principios de los años 90, a partir del clonaje de los primeros subtipos de receptores de nucleótidos y la confirmación de que estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC (8, 9), se produjo una súbita explosión en el interés acerca de las acciones mediadas por nucleótidos en el sistema nervioso. En la actualidad está firmemente establecido que los nucleótidos juegan papeles clave en la neurotransmisión y neuromodulación en diferentes áreas del cerebro y la médula espinal. Además de estas acciones a corto plazo, los nucleótidos pueden mediar también efectos a largo plazo en las células neurales, como es la diferenciación, crecimiento de neuritas, supervivencia o muerte celular. Mecanismos purinérgicos y subtipos de receptores específicos están implicados en varias condiciones patológicas, incluyendo trauma cerebral e isquemia, enfermedades neurodegenerativas que implican reacciones inflamatorias e inmunes, así como en desórdenes neuropsiquiátricos, incluyendo la depresión y la esquizofrenia (10, 11).

deoxiadenosina 3',5'-bisfosfato; MRS2578, 1,2-di-[(3-isotiocianato fenil)-tioureido]butano; nAChR, receptor nicotínico de acetilcolina; NANC, transmisión no-adrenérgica no-colinérgica; NMDA, ácido N-metil-D-aspartico; NOS, óxido nítrico sintasa; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PKA, proteína quinasa dependiente de AMPc; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C; PPADS, ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2'-4'-disulfónico; RT-PCR, trascripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa; sAPPα, ectodominio de la APP generado por la α-secretasa; SCG, ganglio cervical superior; SNC, Sistema Nervioso Central; STAT3, transductor de señal y activador de la transcripción 3; TNP-ATP, 2',3'-O-(2,4,6)-trinitrofenil-ATP; 2MeSATP, 2-metiltio-ATP.

El papel extracelular del ATP o cualquier otro nucleótido requiere de la presencia de este compuesto en el medio extracelular. En este sentido, se ha descrito la presencia de ATP y otros nucleótidos en una amplia variedad de vesículas de almacenamiento y secreción, como son las vesículas aminérgicas y colinérgicas en tejidos neurales o neuroendocrinos, o los gránulos de plaquetas y mastocitos (11). El almacenamiento vesicular y la liberación exocitótica de nucleótidos junto con otros neurotransmisores es un hecho firmemente establecido (12) y las propiedades cinéticas del transportador vesicular de nucleótidos, que exhibe una regulación mnemónica, han sido estudiadas por nuestro grupo (13, 14). Sin embargo, la señalización extracellular mediada por ATP y nucleótidos está tan ampliamente extendida que deben existir otros mecanismos para la liberación de nucleótidos diferentes de su secreción exocitótica. Numerosas proteínas de membrana, como pueden ser algunos miembros de la familia ABC (ATP-binding cassette), miembros de la familia de ecto-ATPasas conocida como CD-39, o hemicanales de conexinas o panexinas, se han postulado como posibles mediadores de la liberación no-quantal o no exocitótica de nucleótidos, constituyendo ésta en la actualidad una fértil área de debate e investigación (11). Los efectos fisiológicos de los nucleótidos extracelulares finalizan por acción de enzimas de la membrana plasmática con su sitio catalítico orientado extracelularmente (ectonucleotidasas), las cuales generan fosfato libre y los correspondientes nucleósidos como productos finales de la hidrólisis de los nucleótidos (15).

Los receptores de nucleótidos se dividen en dos grandes familias, atendiendo a la estructura molecular del receptor y a los mecanismos de transducción de señal acoplados a su activación: canales iónicos activados por ligando (receptores P2X) y receptores acoplados a proteínas G (receptores P2Y). Hasta la fecha, en mamíferos se han clonado y caracterizado farmacológicamente siete subtipos de receptores P2X (P2X1-P2X7) y ocho subtipos de receptores P2Y (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}) (16). La nomenclatura de los receptores P2X utilizada a lo largo de esta revisión tiene en cuenta las últimas directrices del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR), que recomienda evitar el uso de subíndices para designar a las subunidades que forman parte de los canales iónicos operados por ligando (17).

RECEPTORES IONOTRÓPICOS P2X

Los receptores P2X son canales iónicos insertados en la membrana plasmática que se activan por la unión del ATP extracelular y una vez activados permiten el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño (Na⁺, K⁺ y Ca²⁺). Se han

identificado, hasta la fecha, siete subunidades P2X diferentes, denominadas P2X1 a P2X7, que se ensamblan formando homo- o hetero-oligómeros que dan lugar a canales funcionales (18, 19). La diversidad de esta familia de receptores se ha visto ampliada con la identificación de nuevas isoformas, que son el resultado del procesamiento diferencial o «splicing» alternativo del pre-ARNm de algunas de las subunidades (20). Además, se ha descrito la existencia de polimorfismos en el gen de la subunidad P2X7, alguna de cuyas variantes podrían estar implicadas en el pronóstico de ciertas formas de leucemia (21).

Las subunidades P2X comparten una significativa homología de secuencia entre sí (40-50% de aminoácidos idénticos) y no tienen relación secuencial con los receptores ionotrópicos de otros neurotransmisores como, por ejemplo, las familias iGluR, GABA_A, y nAChR. Además, el perfil de hidrofobicidad revela tan sólo dos posibles segmentos transmembrana en lugar de los tres (iGluR) o cuatro (nAChR) segmentos transmembrana presentes en estos otros receptores (22). Los receptores P2X, por tanto, constituyen una nueva familia estructuralmente diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando (18, 19).

Características estructurales

Las subunidades P2X son proteínas cuyo tamaño oscila entre los 379 aminoácidos del receptor P2X6 y los 595 del P2X7. Como se ha mencionado anteriormente, todos ellos poseen dos segmentos hidrofóbicos (M1 y M2), con longitud suficiente para atravesar la membrana plasmática (Figura 1). Ambos extremos, N- y C-terminal, son intracelulares, mientras que el bucle entre M1 y M2 es extracelular y en él se encuentra el sitio de unión de ligandos y de interacción con los antagonistas (18, 19). El extremo N-terminal tiene un tamaño uniformemente corto (24-31 aminoácidos) en todas las subunidades P2X. El extremo C-terminal es muy variable en secuencia siendo inusualmente grande en la subunidad P2X7, con más de 200 aminoácidos y un dominio hidrofóbico extra (18, 19). La topología de membrana propuesta para estos receptores permitiría a esta región interaccionar con proteínas intracelulares. Así, por ejemplo, la zona intracelular del receptor P2X7 se encuentra asociada a un complejo de 11 proteínas, muchas de las cuales forman parte del citoesqueleto y participan en su organización además de transmitir señales como consecuencia de la activación de dicho receptor (23).

Sorprendentemente, las regiones más conservadas se encuentran en la región extracelular, no en los segmentos transmembrana como ocurre en otras fa-

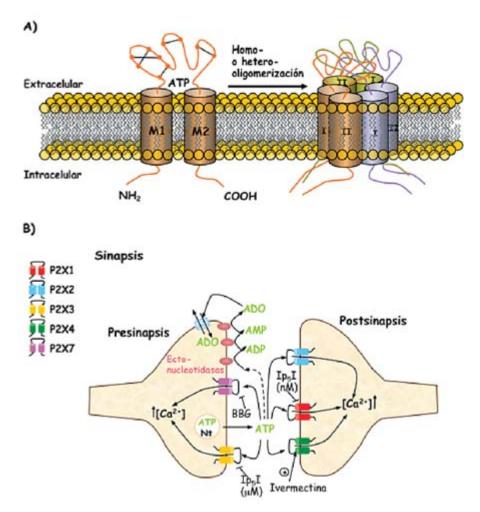


Figura 1. Representación esquemática de la topología transmembrana y la estructura trimérica de los receptores P2X y de su distribución preferentemente pre- o post-sináptica en el SNC. A) En el esquema se muestra la topología propuesta para las subunidades P2X, que estarían constituidas por dos segmentos transmembrana (M1 y M2), extremos N- y C-terminal intracelulares y un gran bucle extracelular (no mostrado a escala) donde se localiza el sitio de unión del ATP. Se indican también los 10 residuos de cisteína (circulos naranja), absolutamente conservados en todas las subunidades P2X, que participan en la formación de puentes disulfuro. En el esquema se muestra, asimismo, la estructura trimérica propuesta para los receptores P2X. B) Los receptores P2X se encuentran presentes tanto a nivel pre- como postsináptico, siendo las subunidades P2X3 y P2X7 las que se localizan de manera preferente en la presinapsis, mientras que el resto de subunidades estarían presentes, principalmente, en dendritas y somas, si bien ninguna de estas localizaciones es completamente excluyente. La estimulación de los receptores P2X conduce a un incremento en los niveles intracelulares de Ca²+ y a la activación subsiguiente de diferentes mecanismos de señalización.

milias de receptores. De esta forma, en el bucle M1-M2 se pueden distinguir 10 residuos de cisteína absolutamente conservados en todos los receptores P2X clonados (Figura 1), con entrecruzamientos por puentes disulfuro que contribuyen a la estructura terciaria de la proteína y regulan además la translocación del receptor a la membrana (18, 19, 24). El segmento de unión entre ambos dominios transmembrana contiene también residuos de histidina (no conservados en todos los receptores P2X) que pueden estar implicados en la unión de metales e iones H⁺ que regulan la actividad del canal (18, 19, 25). Los receptores P2X se encuentran glicosilados *in vivo*. Los restos glicosilados son extracelulares y también necesarios para la inserción de las proteínas en la membrana plasmática y la potencia de unión del ligando (19, 26).

Oligomerización

Por analogía con los receptores ionotrópicos conocidos, se postula que los receptores P2X están formados por el ensamblaje de varias subunidades. Queda por determinar el número exacto de subunidades que contribuyen a la formación del canal activo. Mediante una amplia batería de aproximaciones experimentales, que incluye el uso de antagonistas con grupos reactivos bifuncionales que entrecruzan covalentemente las subunidades y electroforesis en condiciones no desnaturalizantes (27), el empleo de construcciones formadas por la concatenación de subunidades P2X2 (28), el análisis de la cinética de apertura de los canales P2X2 (29) o la utilización de las técnicas de microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica (30), se ha llegado a la conclusión de que los complejos triméricos constituyen un elemento estructural esencial de los receptores P2X (Figura 1).

Cada una de las subunidades P2X puede formar receptores homoméricos, aunque la formación de homómeros P2X5 y P2X6 presenta mayor dificultad (31). Una característica distintiva de los receptores P2X, al contrario de lo que es norma general para los receptores ionotrópicos de otros transmisores (glutamato, GABA), es que estos homo-oligómeros forman canales activos (19, 32). Estudios de co-inmunoprecipitación han mostrado que, además de estos homo-oligómeros, las distintas subunidades P2X pueden interaccionar entre sí para formar hetero-oligómeros (33). Hasta la fecha se han caracterizado siete de estos receptores heteroméricos, los formados por la combinación de subunidades P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/6, P2X4/6 y P2X4/7 (34).

Características biofísicas y farmacológicas

Todos los receptores P2X son permeables a Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. La permeabilidad relativa para cada uno de estos iones varía según la subunidad P2X implicada (35), si bien los receptores P2X presentan, en general, una elevada permeabilidad al Ca²⁺, similar o incluso superior a la descrita para los canales activados por acetilcolina o glutamato (36). La principal consecuencia de la activación de los receptores P2X es un incremento transitorio en la concentración intracelular de Ca²⁺ libre ([Ca²⁺]_i) debido, por una parte, a la despolarización de la membrana, que induce la apertura de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, lo que se suma a la entrada de Ca²⁺ a través del propio canal P2X. El incremento del calcio citosólico dispara posteriormente una serie de eventos intracelulares, en parte a través de la activación de MAPK, PKC y calmodulina (37). Así, por ejemplo, nuestro grupo ha descrito como la estimulación del receptor P2X7 conduce a la activación, dependiente de Ca²⁺/calmodulina, de la CaMKII en neuronas granulares de cerebelo (38).

Los receptores homoméricos P2X1 y P2X3 presentan una elevada afinidad por el ATP, son activados por el análogo sintético de ATP α,β-meATP y sufren una marcada desensibilización, inactivándose totalmente tras 1-2 segundos de exposición al agonista; además, la recuperación del canal tras la desensibilización es extremadamente lenta (19, 32). Por otra parte, los receptores homoméricos P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7 muestran, en general, una menor afinidad por el ATP, son insensibles al α,β-meATP (excepto el P2X6) y su desensibilización es menos marcada. En este sentido destaca especialmente el receptor P2X7 que requiere concentraciones de ATP inusualmente altas (>100 μM) para su activación y que no muestra desensibilización tras varios segundos, e incluso minutos, en presencia del agonista (19, 32). Otra característica distintiva del P2X7 es que, en determinados tipos celulares, la estimulación prolongada del receptor conduce a la apertura de un poro en la membrana que permite el paso de cationes de elevado peso molecular (hasta 900 Da). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la formación del poro no es una característica intrínseca del receptor P2X7 y que dicho poro podría residir en una proteína distinta (probablemente de la familia de las panexinas) con la que el receptor P2X7 interacciona, directa o indirectamente, tras su activación (39).

Respecto a los receptores heteroméricos, éstos por lo general mezclan características o propiedades de los correspondientes receptores homoméricos. Así, por ejemplo, el receptor heteromérico P2X2/3 presenta respuestas a α,β-meATP, características de los receptores homoméricos P2X3 pero, sin embargo, se desensibiliza lentamente, al igual que ocurre con los receptores homoméricos P2X2 (40).

El 2MeSATP es un buen agonista sobre todos los receptores P2X y el BzATP para los receptores P2X1, P2X5 y P2X7, con una afinidad 10-30 veces mayor que el ATP en este último (32). Otros ligandos como el ADP, los dinucleótidos de adenina o los nucleótidos de uracilo son generalmente malos agonistas o totalmente ineficaces sobre los canales P2X.

La suramina y el PPADS son antagonistas no selectivos que bloquean la mayoría de los receptores P2X (y, en el caso de la suramina, también muchos de los P2Y). Los compuestos trinitrofenolderivados, como el TNP-ATP, también actúan como antagonistas de los receptores P2X siendo, sin embargo, unas 300 a 4000 veces más potentes sobre los subtipos P2X1, P2X3 y P2X2/3 que sobre el resto de los P2X (32). El diinosina pentafosfato, Ip_sI, es un bloqueante muy potente del receptor P2X1 y en menor medida del P2X3 (IC₅₀ 3 nM y 3 µM respectivamente) (32, 41). Otro notable antagonista es el Brilliant Blue G (BBG) que, a concentraciones en el rango nM, bloquea el receptor P2X7 (32). Este compuesto, sin embargo, también actúa, aunque con mucha menor potencia, sobre los canales P2X2 y P2X4. El receptor P2X7 está presente en células del sistema inmune, así como en la glía reactiva, donde parece jugar un papel en los procesos de inflamación y dolor. Debido a ello, en los últimos años se ha venido desarrollando un considerable esfuerzo para generar antagonistas potentes y selectivos de este subtipo de receptor, con vista a su uso en aplicaciones terapéuticas. Fruto de este trabajo, recientemente han aparecido dos nuevos antagonistas, A-740003 y A-438079, con actividad antinociceptiva y antiinflamatoria (42). Para mayor complejidad, la potencia y efectividad de los distintos agonistas y antagonistas depende en ocasiones de la especie. Es el caso de la isoquinolina KN-62, que inhibe el receptor P2X7 humano y de ratón, pero es inactivo en rata (32). En la Figura 2 se recogen algunos de los compuestos más utilizados en la caracterización farmacológica de los receptores P2X.

RECEPTORES METABOTRÓPICOS P2Y

Los receptores metabotrópicos P2Y responden a nucleótidos de purinas y pirimidinas y se incluyen en la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Dentro de esta superfamilia de receptores, y atendiendo a la homología en su secuencia, se distinguen la familia A, que es la mas amplia e incluye todos los receptores relacionados con la rodopsina y los receptores β-adrenérgicos, entre otros; la familia B, que contiene los receptores relacionados con el receptor de glucagón; la familia C, que incluye a los receptores relacionados con los receptores metabotrópicos de glutamato y los GABA_B, etc.

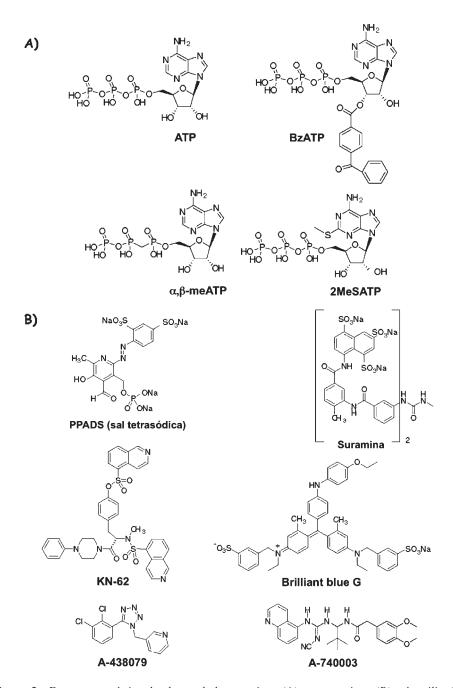


Figura 2. Estructura química de alguno de los agonistas (A) y antagonistas (B) más utilizados en la caracterización farmacológica de los receptores P2X.

Los receptores de nucleótidos P2Y pertenecen a la familia A, a la que también pertenecen los receptores de opioides, canabinoides y adenosina entre otros (43).

Hasta la fecha, se han clonado en mamífero, caracterizado farmacológicamente y aceptado como integrantes de la familia P2Y los receptores denominados P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (16, 44). El salto en la numeración se debe a una adscripción errónea de algunos receptores como miembros de esta familia, bien porque se trata de ortólogos en especies no-mamíferas de otros receptores P2Y (este es el caso, por ejemplo, del receptor p2y3, que parece ser el homólogo en aves del P2Y₆), bien porque se trata de receptores que, aún teniendo una elevada homología de secuencia con los P2Y, no presentan, sin embargo, evidencias funcionales de que respondan a nucleótidos. Este es el caso, por ejemplo, del receptor p2y7 que ha demostrado ser un receptor de leucotrienos (16, 44).

Características estructurales

Los receptores P2Y poseen secuencias de aminoácidos de entre las más cortas dentro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), entre 328-377 aminoácidos, con un peso molecular de 41 a 53 kDa antes de sufrir el proceso de glicosilación (45). Como en el caso de otros receptores de esta superfamilia, presentan 7 segmentos transmembrana, el extremo N-terminal es extracelular y el C-terminal citosólico. Presentan un dominio amino-terminal corto, al igual que el tercer bucle intracelular. La homología de secuencia dentro de este grupo no es muy alta, del orden del 35-40% de identidad promedio, pero sí suficiente para configurar una familia definida dentro de la superfamilia GPCR. La homología con otros receptores es baja (<25%) y, sorprendentemente, los receptores de adenosina están muy alejados de la familia P2Y (46).

Hasta hace unos años se pensaba que los receptores GPCR se encontraban en la membrana en forma de monómeros. Sin embargo, desde mediados de los años 90, se ha empezado a pensar en estos receptores como dímeros u oligómeros. De hecho, dicha agregación podría ser esencial para su correcto tráfico y expresión en la membrana (47). Hay evidencias que apuntan a que el receptor P2Y₂ humano forma homodímeros (48). Los receptores P2Y₁ y P2Y₁₁ parecen asociarse para formar hetero-oligómeros cuando se coexpresan en células HEK (49). También en experimentos de expresión *in vitro* se ha demostrado el co-ensamblaje del receptor de adenosina A1 con los receptores P2Y₁ o P2Y₂, siendo estos los únicos ejemplos de dimerización entre receptores P2Y y no-P2Y que se conocen hasta la fecha (50, 51).

Características farmacológicas

La familia de receptores P2Y se puede dividir en función de la selectividad por el ligando que los activa. Un primer grupo de receptores, que incluye al P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃, es activado por nucleótidos de adenina, pero no de uracilo. Otro grupo lo forman receptores activados tanto por nucleótidos de adenina como de uracilo (receptores P2Y₂ y P2Y₄), y por último el P2Y₆, que es específico para pirimidinas. Un caso especial es el receptor P2Y₁₄, activado por UDP-glucosa y otros UDP-azúcares. Alternativamente, estos receptores también pueden ser clasificados en dos categorías: Receptores que prefieren nucleótidos tri- (P2Y_{2,4,11}) o difosfato (P2Y_{1,6,12,13,14}) como agonistas (16, 44, 45).

El antagonista de receptores P2 más ampliamente utilizado, la suramina, no solo bloquea la mayoría de los receptores P2Y, sino que, como se ha mencionado anteriormente, también antagoniza varios de los receptores P2X. Otros antagonistas de los receptores P2Y son, sin embargo, más selectivos. Los compuestos derivados de la adenosina 3',5'- y 2',5'-bisfosfato pueden actuar selectivamente como antagonistas competitivos del receptor P2Y₁, siendo los compuestos más potentes los denominados MRS2179 y MRS2279. También se han desarrollado antagonistas selectivos, con afinidades nanomolares, para el receptor P2Y₆, como es el caso del MRS2578. El derivado del ATP cangrelor (AR-C69931MX) actúa como antagonista reversible del receptor P2Y₁₂ humano, pero no selectivamente ya que también bloquea el receptor P2Y₁₃. Asimismo, la ticlopidina y el clopidogrel, fármacos ampliamente utilizados como anticoagulantes para evitar complicaciones tras el infarto de miocardio y en la cirugía traumática, una vez metabolizados en el hígado, producen un metabolito que es un bloqueante efectivo de los receptores P2Y₁₂ (16, 44, 45). En la Figura 3 se recogen algunos de los agonistas y antagonistas mas ampliamente utilizados en el estudio de los receptores P2Y.

Señalización intracelular mediada por receptores P2Y

Los receptores P2Y activan diversos mecanismos de señalización intracelular. Por un lado, los receptores P2Y_{1, 2, 4, 6, 11} están acoplados principalmente a la fosfolipasa C (PLC), a través de una proteína G_{q/11} insensible a toxina pertúsica. Como resultado del acoplamiento a la PLC y la generación de IP₃, los receptores P2Y producen incrementos en la concentración intracelular de Ca²⁺ mediante la salida de calcio de reservorios intracelulares y activan la proteína quinasa C (PKC) en las células que los expresan (37), activando así numerosas

Figura 3. Estructura química de los agonistas (A) y antagonistas (B) más usuales de los receptores P2Y.

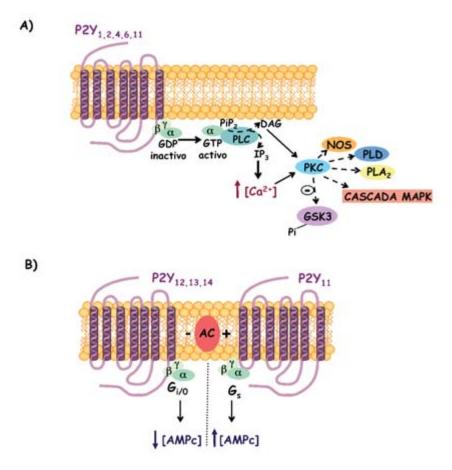


Figura 4. Mecanismos de señalización intracelular activados por los receptores P2Y. A) La mayoría de los receptores P2Y están acoplados, a través de una proteína G, a la fosfolipasa C (PLC) e inducen la movilización de calcio de reservorios intracelulares y, finalmente, la activación de la proteína quinasa C (PKC). De manera secundaria, los receptores P2Y pueden poner en marcha mecanismos posteriores de señalización, como la activación de la fosfolipasa D (PLD), la fosfolipasa A2 (PLA2), la óxido nítrico sintasa (NOS), la cascada de las MAP quinasas (MAPK), la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa de tipo 3 (GSK3), etc. B) Algunos subtipos de receptores P2Y, sin embargo, están acoplados de manera positiva (P2Y11) o negativa (P2Y12, 13, 14) a la actividad de la adenilato ciclasa (AC), produciendo así modificaciones en los niveles intracelulares de AMPc.

cascadas de señalización secundarias (Figura 4). Entre estos mecanismos se encuentran: La activación de la fosfolipasa D y de la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (52), que prolonga la activación de PKC. La activación de la fosfolipasa A2 y la generación de ácido araquidónico y sus metabolitos (53). La

activación de la óxido nítrico sintasa y la generación de NO (54). La activación, dependiente de PKC, de la cascada de las MAPK en astrocitos (55), células endoteliales (56), plaquetas (57) y osteoblastos (58). La inactivación, dependiente de PKC, de la glucógeno sintasa quinasa GSK-3 en astrocitos (59), etc.

El receptor $P2Y_{11}$ puede además inducir un incremento de los niveles de AMPc por su acoplamiento a una proteína G_s . Los receptores P2Y clonados recientemente, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ y $P2Y_{14}$, parecen estar relacionados mayoritariamente con la disminución de los niveles de AMPc por su acoplamiento a una proteína sensible a toxina pertúsica $G_{i/o}$ (Figura 4), aunque el $P2Y_{13}$ y el $P2Y_{14}$ pueden, de modo adicional, producir incrementos de Ca^{2+} (37, 44). Recientemente, nuestro grupo ha descrito que los nucleótidos inducen la inhibición, dependiente de AKT, de la glucógeno sintasa quinasa GSK-3 y la translocación nuclear de su sustrato, β -catenina, en neuronas granulares de cerebelo de rata, fenómeno que parece estar mediado a través de un receptor $P2Y_{13}$ (60).

RECEPTORES P2X EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Estudios de hibridación in situ, que permiten localizar el ARNm específico de cada subunidad P2X, y ensayos inmunocitoquímicos usando anticuerpos frente a cada una de las siete subunidades P2X han revelado que estas proteínas se encuentran ampliamente expresadas en el sistema nervioso. Sin embargo, se observa una diferente distribución en regiones y en tipos celulares específicos dependiendo de la subunidad de que se trate. Entre los receptores P2X, los que de manera más abundante se expresan en cerebro parecen ser el P2X2, P2X4 y P2X6, mientras que otras subunidades muestran una localización más restringida. La subunidad P2X2 ha sido descrita en cerebelo, hipocampo, hipotálamo y núcleos del tallo cerebral como el *locus coeruleus* (61, 62). Una expresión menor, aunque muy importante, se observa en el córtex, tálamo y, de forma generalizada, en todo el cerebro (20, 63). Esta subunidad se encuentra también abundantemente en neuronas ganglionares y en la médula espinal (61).

Inicialmente se pensó que el receptor P2X1 estaba expresado exclusivamente en músculo liso, localización consistente con su papel mediador en la transmisión sináptica en las uniones neuroefectoras del sistema nervioso autónomo. Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que su distribución es mucho más amplia, pudiéndose detectar también, por ejemplo en neuronas tanto centrales como periféricas (62). Lo mismo ocurre con el receptor P2X3 que fue inicialmente asociado con las estructuras y vías implicadas en la transmisión del dolor (64).

Posteriormente, estudios funcionales han demostrado que está también expresado en otras aéreas del cerebro y vías del sistema autónomo (65, 66).

El receptor P2X4 muestra una expresión substancial en el cerebelo y la médula espinal. Inmunorreactividad con anticuerpos frente a esta subunidad puede observarse también en otras áreas del cerebro como son el cortex, hipocampo, tálamo y tallo cerebral (67).

La subunidad P2X5 es la que muestra una localización más restringida en cerebro aunque está presente de manera abundante en ciertas áreas, como el *nucleus tractus solitarii* (68).

A pesar de haber sido clonado originalmente del cerebro de rata, durante mucho tiempo se postuló que el receptor P2X7 estaba ausente de las neuronas siendo expresado únicamente por células no neurales del sistema nervioso como microglía, linfocitos, macrófagos y astroglía (69). Sin embargo, estudios recientes utilizando técnicas de hibridación in situ más sensibles, así como análisis por RT-PCR han permitido detectar la presencia del ARNm del receptor P2X7 también en neuronas, tanto centrales como periféricas (70, 71). Asimismo, estudios inmunohistoquímicos han permitido detectar la presencia del receptor P2X7 en diversas áreas del SNC, como la médula espinal, médula oblongada (72, 73), cerebelo, estriado, tálamo, amígdala (72, 74) e hipocampo (72, 75), donde este receptor, como también se comentará más adelante, parece estar dirigido selectivamente a las terminales nerviosas.

FUNCIONES DE LOS RECEPTORES P2X NEURONALES

En diversas publicaciones se ha descrito la existencia de receptores P2X postsinápticos, cuya activación llevaría a la despolarización y la generación de potenciales de acción en la célula en la que están presentes (5-7, 76-78). El ATP funcionaría así como un neurotransmisor excitatorio rápido, al estilo de transmisores clásicos como el glutamato. Sin embargo, a pesar de que se ha descrito una muy abundante expresión de receptores de ATP en el sistema nervioso central, la neurotransmisión purinérgica se ha demostrado sólamente en áreas muy discretas, concretamente en la habénula medial (5), el asta dorsal de la médula espinal (6), el *locus coeruleus* (78), las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (7, 77) y en neuronas piramidales de la capa II/III del córtex somato-sensorial (76); donde, además, sólo una pequeña proporción de las sinapsis emplea el ATP como neurotransmisor. Por ello, se ha generalizado la idea de que una elevada proporción de los receptores ionotrópicos de ATP estarían presentes en la zona presináptica. Uno de los papeles principales del ATP en el SNC sería, por tan-

to, el de funcionar como un modulador que, mediante su interacción con los receptores presinápticos, regulase la secreción de neurotransmisores (79).

La funcionalidad de los receptores ionotrópicos presinápticos es algo que ha aparecido recientemente, como el medio para regular de modo drástico la capacidad secretora de las terminales. Prácticamente todos los receptores ionotrópicos descritos en soma neural, han sido ahora caracterizados en la zona secretora. Es de destacar que en el caso de los receptores de AMPA, GABA, y sobre todo los nicotínicos neurales, su capacidad para regular la secreción de las terminales ha sido ampliamente reseñada en la bibliografía (80). Las referencias a efectos secretores en los que están implicados receptores nucleotídicos son más reducidas y algunas proceden de nuestro laboratorio, donde hemos descrito que la estimulación de las terminales de cerebro medio con ATP induce la liberación de acetilcolina, que puede ser medida con una técnica luminométrica basada en la utilización del enzima colina oxidasa (81), así como la liberación de GABA y glutamato, ambos medidos por HPLC tras su derivatización con el reactivo o-ftalaldehído (82, 83). Esta acción secretora del ATP esta mediada por la activación de receptores P2X, puesto que se bloquea con PPADS y requiere de la presencia de calcio extracelular. Respecto a la composición de estos receptores P2X presinápticos, en trabajos previos del grupo se ha demostrado que la subunidad P2X3 es muy abundante en las terminales del SNC (83, 84). No obstante, hay una serie de terminales que responden a nucleótidos y no presentan marcaje con esta subunidad (84). Recientemente hemos visto que la subunidad P2X7 también está presente en gran abundancia en terminales del SNC. Más del 50% de las terminales presentan marcaje con anticuerpos frente a dicha subunidad y es posible además medir respuestas presinápticas a los agonistas selectivos del P2X7 (74, 85), por lo que toda la señalización mediada por este receptor podría adquirir especial relevancia en los procesos de degeneración sináptica. Otros autores han descrito también una localización presináptica para la subunidad P2X7 (72, 73, 75). Diferentes subunidades, como la P2X1, P2X2 o P2X4 podrían también tener una localización presináptica en diversas regiones del SNC (63, 64, 67, 86).

La facilitación de la liberación de glutamato por receptores P2X presinápticos ha sido descrita también por otros autores, mediante ensayos neuroquímicos y electrofisiológicos en neuronas de la médula espinal (87), el hipocampo (65, 75, 88) o el tallo cerebral (89, 90). En cuanto a los receptores implicados en estos efectos, fueron identificados el P2X1 (65), P2X2 (88), P2X3 y P2X2/3 (65, 90), así como el P2X7 (75, 89). La participación de los receptores P2X2 (88) y P2X7 (91) ha sido confirmada mediante el uso de ratones transgénicos deficientes en estas subunidades. Aparte de la modulación directa de la liberación de glutamato, la acti-

vación del receptor P2X7 también libera GABA en el hipocampo a través de la activación de receptores de glutamato de tipo no-NMDA (75), efecto que está ausente en animales genéticamente deficientes en la subunidad P2X7 (91). En neuronas de la médula espinal en cultivo, el ATP facilita la liberación de GABA mediante la activación de receptores P2X2 presinápticos (92). La liberación de otro transmisor inhibitorio, la glicina, se ve incrementada por activación de receptores P2X en el asta dorsal de la médula espinal (93) y en el núcleo trigémino del tallo cerebral (94). La presencia de receptores P2X facilitadores ha sido descrita también en las terminales noradrenérgicas que inervan el hipocampo, siendo receptores homoméricos P2X1 y P2X3 los que son probablemente responsables de esta acción (66).

En la bibliografía se ha descrito la presencia a nivel presináptico de una amplia variedad de receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos, algunos de los cuales podrían coexistir con los receptores P2X en la misma terminal. Esto abre la posibilidad de un amplio abanico de interacciones o «cross-talk» entre receptores presinápticos en las que los receptores P2X tomen parte. Algunos ejemplos de dichas interacciones han sido descritos en la literatura y aparecen detallados en el siguiente apartado.

Interacción de los receptores P2X con otros receptores ionotrópicos y metabotrópicos a nivel presináptico

En publicaciones previas de nuestro grupo hemos descrito la coexistencia de receptores ionotrópicos de ATP con los receptores nicotínicos neurales en terminales colinérgicas de cerebro medio (81). Esta colocalización de receptores nicotínicos y nucleotídicos en la misma terminal tiene importantes consecuencias funcionales ya que la activación de los receptores nicotínicos inhibe en gran medida la entrada de calcio a través de los receptores P2X, lo que resulta también en una disminución en la liberación de acetilcolina inducida por nucleótidos. En un interesante trabajo de Khakh y col. se describe una inhibición mutua, en las respuestas de entrada de iones, entre receptores de ATP P2X2 y receptores nicotínicos α3-β4 cuando son coexpresados en ovocitos y se esboza la posibilidad de una interacción directa entre ambos tipos de canales (95). Sin embargo, en nuestro modelo experimental de terminales colinérgicas el efecto inhibitorio de los receptores nicotínicos sobre los P2X parece estar mediado por la calcio calmodulina quinasa II, CaMKII, que resulta activada por el incremento de calcio intrasinaptosomal tras la estimulación del receptor nicotínico. El papel clave jugado por este enzima en las terminales nerviosas se vio confirmado mediante el uso del inhibidor de la CaMKII, KN-62, el cual previene completamente el efecto inhibidor inducido por agonistas de los receptores nicotínicos (96). Este es solo un ejemplo de lo complejas que resultan las interacciones entre receptores ionotrópicos en las que los receptores de nucleótidos participan ampliamente y que a pesar de su complejidad es necesario abordar, si queremos llegar a comprender lo que de verdad pasa en la zona presináptica.

Otro tipo de interacciones o regulaciones son las debidas a la presencia de receptores metabotrópicos en la zona presináptica. A este respecto hemos descrito los dramáticos efectos en la actividad de los receptores P2X, causados por la acción de proteínas quinasas y fosfatasas, cuando son activadas o inhibidas bien directamente o, de manera más fisiológica, a través de la activación de receptores presinápticos. La afinidad de los receptores P2X por sus agonistas fisiológicos disminuye en situaciones en los que la actividad, tanto de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) como de miembros de la familia PKC, resulta incrementada (97). Por el contrario, el uso de inhibidores de las proteínas quinasas A y C, o la acción de agonistas sobre receptores metabotrópicos acoplados a G, resulta en un incremento tanto de la afinidad de los receptores P2X por sus agonistas como de las respuestas de calcio máximas mediadas por estos receptores. En este sentido, es de destacar la acción de los receptores GABA_R o los A1 de adenosina. En presencia de agonistas de estos receptores, la afinidad de los P2X por sus agonistas nucleotídicos puede incrementarse en 3-5 órdenes de magnitud, pasando los valores de EC₅₀ del rango micro- al nano- y pico-molar (98). Aunque los receptores GABA_B y los A1 de adenosina se encuentran entre los que se localizan de manera más abundante en las terminales sinápticas, la presencia y la acción de otros receptores acoplados a G_i, como los D2, D3 y D4 de dopamina, o la familia de receptores metabotrópicos de glutamato (grupo II y grupo III) deberá ser también analizada en áreas específicas del cerebro.

RECEPTORES P2Y EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La mayoría de los subtipos conocidos de receptores P2Y se expresan en el SNC. Análisis mediante RT-PCR cuantitativa han revelado la presencia de grandes cantidades del ARNm del P2Y₁ y P2Y₁₁ en el cerebro humano, en comparación con otros tejidos (99). El ARNm del P2Y₁ se expresa principalmente en corteza, cerebelo, hipocampo y globo pálido así como en regiones de los ganglios basales, incluyendo el estriado, núcleo acumbens, núcleo caudado y putamen. Tinciones inmunohistoquímicas en secciones de cerebro humano confirmaron una localización principalmente neuronal para el receptor P2Y₁ (100). En

contraste, sólamente son detectables niveles bajos o moderados del mensajero de los receptores P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ en el cerebro humano (99). Ensayos de hibridación in situ de secciones de cerebro humano o de rata han mostrado una localización predominantemente glial para el receptor P2Y₁₂ (101). Análisis por RT-PCR han permitido detectar el ARNm del receptor P2Y₁₃ en distintas regiones del cerebro, como cerebelo, hipocampo, tálamo, sustancia nigra o núcleo caudado (102). Por último, hasta la fecha no se ha descrito una localización neuronal para el receptor P2Y₁₄. Sí se ha visto que es funcional en líneas de astrocitos y microglía, donde se producen incrementos de Ca²⁺ en respuesta a UDP-glucosa (103).

FUNCIONES DE LOS RECEPTORES P2Y NEURONALES

Regulación de canales iónicos por receptores P2Y

Los receptores P2Y regulan una amplia variedad de canales iónicos neuronales, incluyendo canales de Ca²+ activados por voltaje o canales de K+, así como canales iónicos operados por ligando. Aparte de los cambios en las propiedades eléctricas intrínsecas de la neurona, los cambios en la actividad de estos canales iónicos tienen como consecuencia una profunda modificación en la transmisión sináptica, como se comentara más adelante.

La modulación de los canales de Ca²⁺ operados por voltaje por receptores acoplados a proteína G se ha descrito para un elevado número de neurotransmisores. En el caso de los receptores P2Y, son varios los subtipos de estos receptores que pueden estar modulando los canales de Ca2+. Este es el caso de los receptores P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ expresados heterólogamente en neuronas simpáticas, de los que se ha descrito que son capaces de inhibir los canales de Ca²⁺ de tipo N (104-106). De igual modo, esta acción se ha mostrado para los receptores P2Y₁ expresados tanto heterólogamente en neuronas simpáticas (107) como de forma nativa en neuronas de los ganglios dorsales (108). Asimismo, se ha demostrado la inhibición de los canales de tipo N, vía receptores P2Y₁₂ en células PC12 (109). El mismo receptor media una inhibición de las corrientes de Ca²⁺ en neuronas del ganglio SCG (110). En el caso del receptor P2Y₁₃, se han obtenido evidencias de que en células HEK293 (en las que los canales de Ca²⁺ de tipo N se han introducido por transfección) este receptor P2Y es capaz de producir la inhibición de este subtipo de canales de Ca²⁺ (111). En la línea celular híbrida de neuroblastoma x glioma, NG-10815, no solo los nucleótidos de adenina, sino también el UTP y el UDP, fueron capaces de inhibir los canales de calcio de tipo N y L (112). Los nucleótidos no son solo capaces de ejercer efectos inhibitorios sobre los canales de Ca²⁺ neuronales. El ATP, por ejemplo, incrementa las corrientes de Ca²⁺ en neuronas hipocampales (113), si bien el subtipo de receptor implicado en este efecto no ha sido aun completamente elucidado.

Los receptores P2Y pueden usar diferentes vías para regular la función de los canales de Ca^{2+} neuronales: 1) La activación de los receptores P2Y acoplados a proteínas $G_{i/o}$ libera las subunidades $\beta\gamma$ que interaccionan directamente con las proteínas que forman el canal de Ca^{2+} . 2) En algunos casos este mecanismo puede requerir también de un cofactor soluble además de las proteínas G asociadas a membrana. 3) Algunos de los receptores P2Y pueden mediar también una inhibición de este tipo a través de proteínas G insensibles a toxina-pertúsica. 4) La activación de los receptores P2Y acoplados a proteínas $G_{q/11}$, insensibles a toxina-pertúsica, inicia una cascada de señalización que implica la generación de segundos mensajeros difusibles y que lleva a la inhibición de las corrientes de Ca^{2+} . Para otros receptores acoplados a $G_{q/11}$ (como el receptor muscarínico M1 o el de bradiquinina B2) se ha demostrado que esta vía implica la activación de la PLC y la depleción del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) de la membrana (114).

Se han descrito corrientes de K⁺ moduladas por ATP y sus análogos en neuronas de diferentes regiones del SNC, como estriado, hipocampo, y cerebelo (115). La modulación de canales de potasio por nucleótidos ha sido también investigada tras la expresión heteróloga de receptores P2Y en neuronas simpáticas y los canales de potasio más comúnmente analizados fueron los GIRKs y los KCNQ (104-106). Los receptores de nucleótidos P2Y pueden usar diferentes vías para modular la función de los canales GIRK y KCNQ: 1) La activación de los receptores P2Y acoplados a proteínas G_{i/o} libera las subunidades βγ que interaccionan directamente con las proteínas que forman los canales GIRK activándolos. 2) La activación de los receptores P2Y acoplados a proteínas G_{q/11}, insensibles a toxina-pertúsica, lleva a la activación de PLC que utiliza el PIP₂ de la membrana para sintetizar IP₃ y diacil glicerol. La depleción del PIP₂ inhibe los canales GIRK y KCNQ. 3) La acumulación de IP₃ induce la liberación de calcio de reservorios intracelulares y el incremento del Ca²⁺ citosólico inhibe los canales KCNQ vía calmodulina (114).

Aunque se conoce un elevado número de canales iónicos operados por ligando, solo se han descrito unos pocos ejemplos de regulación de estos canales por receptores P2Y. Uno de los ejemplos más prominentes es el del receptor de *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Nucleótidos de adenina y uracilo potencian las corrientes inducidas por NMDA en neuronas piramidales de la capa V del córtex prefrontal, efecto mediado probablemente a través de un receptor P2Y₂ (116)

En contraste, la activación del receptor P2Y₁ en el mismo tipo celular inhibe las corrientes a través del receptor de NMDA (117). Además, el ATP es capaz de inhibir los receptores de NMDA independientemente de su interacción con receptores P2Y, mediante la unión directa del nucleótido al sitio de unión del glutamato en la subunidad NR2B del receptor de NMDA (118).

Otro ejemplo de canal iónico operado por ligando cuya modulación por nucleótidos ha sido descrita es la del receptor de vanilloides 1 (VR1). En neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, las corrientes inducidas por capsaicina a través del receptor VR1 son potenciadas por nucleótidos, siendo probablemente el receptor P2Y, el que está mediando este efecto facilitador (119).

La tercera familia de canales iónicos operados por ligando que pueden ser regulados por los receptores P2Y son los canales activados por ATP; es decir, los receptores P2X. Cuando se coexpresan receptores P2Y₁ o P2Y₂ con el P2X1 en ovocitos de *Xenopus*, su activación potencia las corrientes a través del receptor P2X (120). En neuronas de los ganglios de la raíz dorsal se ha descrito como la activación del receptor P2Y₁ modula el receptor P2X3. Este caso, sin embargo, la modulación es negativa y las corrientes a través de receptor P2X se ven reducidas (121).

Regulación de la transmisión sináptica por receptores P2Y

La capacidad de los receptores P2Y para regular la transmisión sináptica reside principalmente en su capacidad para modular diversos canales iónicos, como anteriormente se ha descrito. Los canales de Ca²+ activados por voltaje, en particular los de tipo N y P/Q, están localizados en las terminales presinápticas y conectan la llegada de los potenciales de acción con la entrada de calcio a través de la membrana y la consiguiente liberación exocitótica de los neurotransmisores contenidos en las vesículas sinápticas. Así, la regulación de estos canales iónicos por receptores P2Y conduce a cambios en la transmisión sináptica vía la modulación presináptica de la liberación de neurotransmisores. En contraste, la regulación de los canales GIRK y KCNQ por los receptores P2Y va a producir preferentemente cambios en la excitabilidad postsináptica. Respecto a los canales iónicos operados por ligando su modulación va a causar diferentes alteraciones en la señalización dependiendo de su localización.

En resumen, los receptores P2Y van a mediar cambios dependientes de nucleótidos en la transmisión sináptica a través de efectos tanto pre como postsinápticos. En varias regiones del SNC los nucleótidos han mostrado ser capaces tanto de inhibir como de incrementar la liberación de acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina, glutamato, GABA y glicina. Los efectos potenciadores de la libración de neurotransmisores parecen estar mediados principalmente por receptores de la familia P2X, como se ha comentado previamente. Los efectos inhibidores de los nucleótidos, sin embargo, suelen implicar receptores de tipo P2Y, como ha sido descrito para la liberación de noradrenalina (122) y serotonina (123). En neuronas hipocampales, receptores P2Y presinápticos median la inhibición de la liberación de glutamato, pero no de GABA (124). En la habénula medial un receptor de tipo P2Y₄ incrementa la liberación de glutamato mientras que un receptor presumiblemente de tipo P2Y₂ media una inhibición en la secreción de este neurotransmisor (125).

Mediante su interacción con receptores P2Y postsinápticos los nucleótidos pueden actuar también inhibiendo o incrementando la transmisión sináptica. En el córtex prefrontal y parietal, por ejemplo, la activación de un receptor de tipo P2Y₁ reduce el componente NMDA de la transmisión glutamatérgica (117). En contraste, en neuronas sensoriales el mismo subtipo de receptor facilita la generación de impulsos inducidos por toque (126).

RECEPTORES P2 EN CÉLULAS GLIALES

La glía ha sido considerada tradicionalmente como un participante pasivo en la transmisión sináptica. Sin embargo, evidencias recientes han demostrado que existe una comunicación dinámica entre glía y neurona en la sinapsis. Neurotransmisores liberados por las neuronas presinápticas inducen respuestas en la glía adyacente. Asimismo, la glia libera neurotransmisores que pueden actuar tanto sobre las terminales presinápticas, incrementando o disminuyendo la secreción de neurotransmisores, como sobre las neuronas postsinápticas, produciendo respuestas excitatorias o inhibitorias. Por ello, en la actualidad la glía está considerada como un componente activo de la sinapsis en la que participa regulando dinámicamente la transmisión sináptica (127). La función de las células gliales está regulada también por nucleótidos a través de receptores P2X y P2Y. Los astrocitos, por ejemplo, expresan un elevado número de receptores P2Y, así como algunos de los receptores P2X (128, 129). El ATP y otros nucleótidos, mediante la activación de estos receptores P2, inducen cambios tanto a corto plazo (ej: incrementos en la concentración intracelular de Ca²⁺) como a largo plazo (proliferación, diferenciación y muerte celular) en los astrocitos (103, 128-130).

La estimulación de los astrocitos por medios farmacológicos, así como su estimulación mecánica u osmótica, induce la liberación de ATP (130). El ATP liberado inicia y mantiene ondas de calcio mediante la activación de receptores P2Y₁ en los astrocitos (130, 131). Estas ondas se definen como oscilaciones de la concentración de Ca²⁺ libre intracelular que se propagan entre astrocitos vecinos y están consideradas como un sistema de procesamiento de la información que opera en paralelo con los circuitos neuronales.

Además de ATP los astrocitos también liberan aminoácidos neurotransmisores, tanto excitatorios (glutamato, aspartato) como inhibitorios (GABA). La estimulación de receptores P2X7 en los astrocitos induce la liberación de glutamato, proporcionando así una conexión entre la secreción de ATP y glutamato (132). El ATP y el glutamato liberados por los astrocitos parecen modular tanto la transmisión sináptica en sistemas neuronales, como la propagación de ondas de calcio en las redes de astrocitos (127, 133). Finalmente, la estimulación del receptor P2X7 no solo induce la secreción de glutamato sino también la de GABA en astrocitos de cerebro o en células de Müller de la retina (134), lo que puede conducir a una potenciación de la transmisión sináptica inhibitoria (135).

La microglía representa en torno al 5-10% del total de la glía y constituye el principal elemento celular con función inmune en el SNC. Las células de la microglía, que se encuentran en un estado inactivo o de reposo en condiciones normales, actúan como sensores frente a un amplio rango de estímulos liberados en situaciones patológicas, como hipoxia, infección o trauma (136). Dichos estímulos activan la microglía induciendo cambios en su morfología y expresión de genes, así como su proliferación, migración y acumulación en los sitios del cerebro afectados. La microglía activada produce y libera diferentes mediadores químicos, como las citoquinas inflamatorias, que inducen respuestas inmunológicas y pueden actuar también sobre las neuronas vecinas alterando su función (137). El ATP y otros nucleótidos se encuentran entre los principales estímulos que pueden inducir la activación, cambios morfológicos, proliferación, migración y liberación de citoquinas de las células microgliales (138-141). La naturaleza de la respuesta purinérgica depende de la concentración de ATP; baias concentraciones de ATP actúan a través de receptores P2Y, mientras que elevadas concentraciones activan el receptor P2X7 (142). En co-cultivos de neuronas corticales y microglía de rata, tanto el ATP como el agonista P2X7 BzATP, actuando sobre los receptores P2X7 microgliales, causan un daño en las células neurales (143). La estimulación de los receptores P2X7 también incrementa la expresión inducida por IFN-γ de la NOS de tipo II y la subsecuente producción de NO en la línea microglial murina BV-2 (144). El ATP derivado de astrocitos

induce la liberación de interleuquina-1 beta mediante la activación de receptores P2X7 en la microglía (145).

La señalización a través de P2X4 en la microglía ha sido implicada en la generación del dolor neuropático: una forma de dolor crónico que aparece tras la lesión de un nervio periférico, producida por compresión con el hueso, cirugía, infecciones, cáncer o diabetes. Este tipo de dolor puede ser tan severo que incluso un ligero toque resulte intensamente doloroso, es generalmente resistente a los tratamientos analgésicos actualmente disponibles y condiciona la calidad de vida de millones de personas en todo el mundo. Hay evidencias de que tras la lesión de un nervio periférico la microglía de la médula espinal (en el lado del nervio afectado) se transforma en su fenotipo activado e incrementa la expresión del receptor P2X4. La activación del receptor P2X4 conduce a incrementos de la concentración intracelular de Ca²+ y a la liberación de factores difusibles, como el BDNF, por la microglía activada. El BDNF actuaría entonces sobre las neuronas del asta dorsal de la médula espinal incrementando su excitabilidad. El bloqueo farmacológico del receptor P2X4 o su supresión (mediante ARN antisentido) produce una reducción del dolor neuropático (146).

PAPEL DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS EN LA NEURODEGENERACIÓN Y NEUROPROTECCIÓN

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es la más representativa entre las enfermedades neurodegenerativas que cursan con anomalías del movimiento. La enfermedad se caracteriza por bradiquinesia, rigidez muscular, temblor con movimientos involuntarios de las manos y trastorno del equilibrio, que dificulta la marcha. En el cerebro de los pacientes afectados de Parkinson se observan unas inclusiones en el citoplasma de las neuronas que se denominan cuerpos de Lewy. Aunque los cuerpos (inclusiones) de Lewy pueden aparecer en otras neuronas, su presencia en la sustancia nigra, junto con la pérdida de células dopaminérgicas que inervan el estriado, se consideran aspectos neuropatológicos esenciales de esta enfermedad.

Mediante experimentos de microdiálisis *in vivo*, se ha comprobado que la aplicación de ATP incrementa la liberación de dopamina en el estriado a través de la estimulación de receptores P2Y (147). Resultados de nuestro grupo, que muestran la presencia de receptores P2X capaces de inducir incrementos en la [Ca²⁺], en ter-

minales aminérgicas de los ganglios basales, apoyarían también la idea de una regulación de la neurotransmisión dopaminérgica por los receptores P2 (148).

Estudios inmunohistológicos muestran la presencia de diferentes subtipos de receptores P2X y P2Y en los ganglios basales, particularmente en el estriado y la sustancia nigra, donde están presentes tanto en neuronas (dopaminérgicas y GABAérgicas) como en astrocitos. La denervación dopaminérgica causa una significativa reorganización de los receptores P2 en estos núcleos, revelando por tanto su participación en el circuito nigroestriatal lesionado y sugiriendo su potencial implicación en los mecanismos de la enfermedad de Parkinson (149).

El ATP y el glutamato facilitan la liberación de taurina en la sustancia nigra. La taurina liberada puede cumplir dos funciones diferentes: por un lado, puede actuar como un neurotransmisor inhibitorio (como ha sido previamente descrito para este aminoácido), pero puede también funcionar como un regulador osmótico en la sustancia nigra e influir así en la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas nigrales en la enfermedad de Parkinson (150).

Los diadenosina polifosfato (Ap_nA, n=2-6) son un una familia de compuestos, estructuralmente relacionados con el ATP, que pueden actuar como ligandos endógenos de los receptores P2X y P2Y en una amplia variedad de tipos celulares y tejidos (151). Uno de estos compuestos, el Ap₄A, protege frente al daño inducido por el tratamiento con 6-hidoxidopamina en el cerebro de rata (152). La inyección de 6-hidroxidopamina en el haz nigroestriado induce una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y ha sido un tratamiento ampliamente utilizado para generar modelos animales que mimeticen las disfunciones del Parkinson en humanos.

Enfermedad de Alzheimer

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una pérdida gradual de la memoria de acontecimientos recientes y de la capacidad de razonar y de manipular objetos cotidianos. La progresión de la enfermedad lleva a una pérdida completa de la capacidad cognitiva con total apatía emotiva y desconexión del entorno. Desde el punto de vista de la fisiopatología, la enfermedad se caracteriza por una atrofia notable de la corteza cerebral, con aparición de las placas seniles, que son acúmulos extracelulares constituidos mayoritariamente por el péptido β -amiloide. En el interior de las neuronas aparecen otros acúmulos conocidos con el nombre de ovillos neurofibrilares, constituidos en su mayoría por una forma hiperfosforilada de la proteína tau (en esta

monografía se incluye un capítulo dedicado a esta proteína y su implicación en la progresión de la enfermedad). En los últimos tiempos se han aportado también argumentos a favor de que la inflamación podría jugar un papel importante en la enfermedad de Alzheimer (153).

El ATP liberado debido a la excitación o al daño neuronal puede incrementar la producción de prostaglandina E2 inducida por citoquinas en los astrocitos y contribuir así a la inflamación crónica que se observa en la enfermedad de Alzheimer (154).

La expresión del receptor P2X7 se encuentra incrementada en el cerebro de pacientes afectados de Alzheimer, así como en modelos de ratones transgénicos empleados en el estudio de esta enfermedad (155, 156). La estimulación del receptor P2X7 en macrófagos y microglía modifica la secreción de citoquinas inducida por el péptido β-amiloide (Aβ), lo que puede jugar un papel en las respuestas inflamatorias en el Alzheimer (157). Asimismo, la activación del receptor P2X7 con ATP o BzATP induce la generación del ión superóxido en cultivos primarios de microglía. En un sistema de co-cultivo, la microglía estimulada por ATP o BzATP induce la muerte de neuronas corticales, lo que *in vivo* podría estar contribuyendo a la neurodegeneración (156). Los receptores P2X7 podrían, a la luz de estos resultados, constituir una diana terapéutica de utilidad el tratamiento de la patología de Alzheimer.

En secciones post-mortem del cerebro de pacientes de Alzheimer el receptor P2Y₁ se encuentra asociado con las estructuras aberrantes que son características de esta enfermedad, como son los ovillos neurofibrilares y las placas seniles (158). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce cuál es el significado de esta distribución celular alterada del receptor PY₁ en el cerebro afectado de Alzheimer.

La activación del receptor $P2Y_2$ estimula el procesamiento de la proteína APP (proteína precursora del amiloide) por la α -secretasa, lo que evita la formación del fragmento β -amiloide (A β), e incrementa la producción del péptido no amiloidogénico sAPP α , del que se ha comprobado que tiene efectos neuroprotectores y mitogénicos. La activación del receptor $P2Y_2$ en el cerebro podría, de esta manera, incrementar la viabilidad neuronal (159).

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington se caracteriza por la aparición de movimientos incontrolados, denominados coreicos, con pérdida de capacidades intelectua-

les y cambios de conducta. Es debida a la expansión del triplete CAG en el gen que codifica la proteína huntingtina. Los primeros síntomas aparecen al final de la segunda década de vida y su severidad depende del expandido del triplete CAG.

Con objeto de determinar los cambios que la huntingtina mutada induce en la neurotransmisión mediada por P2X, nuestro grupo ha medido la expresión (tanto a nivel de mensajero como de proteína) de los diferentes receptores P2X en las estructuras mas afectadas, estriado y corteza, en dos modelos transgénicos de la enfermedad de Huntington. Como resultado de estos estudios hemos detectado un incremento en la expresión de receptores P2X, así como un cambio en las propiedades cinéticas de estos canales, en las proyecciones corticoestriatales de los ratones modelo de Huntington. Alteraciones en la respuestas mediada por los P2X se observaron también en las terminales de neuronas corticales en cultivo transfectadas con la huntingtina mutada y fusionada con la GFP. Estos cambios en las respuestas mediadas por P2X se tradujeron en un aumento de la susceptibilidad de las neuronas a la muerte celular. El tratamiento *in vivo* con antagonistas de los receptores P2X disminuye el déficit motor y la pérdida de peso de los ratones huntingtonianos, así como la incidencia de la muerte cortical (160).

Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa causada por la degeneración de las neuronas motoras en la corteza motora, el tallo cerebral y la médula espinal, que resulta en una progresiva atrofia y debilidad de los músculos, seguida de parálisis, y que generalmente conduce a la muerte del paciente en los 2-5 años tras el diagnóstico.

La ivermectina, un compuesto ampliamente empleado como agente antiparasitario, es un modulador alostérico que potencia selectivamente el efecto de los agonistas sobre el receptor P2X4. El tratamiento con ivermectina protege a las neuronas motoras de la excitotoxicidad mediada por receptores de AMPA. Asimismo, la ivermectina incrementa la esperanza de vida en un ratón transgénico, modelo de ELA, que presenta una mutación en el gen que codifica para la superóxido dismutasa 1 (161).

La lesión de un nervio puede conducir a la liberación de cantidades masivas de ATP y producir cambios en la expresión de receptores purinérgicos que participen en la respuesta al daño. Así, por ejemplo, la expresión de los receptores P2X1 y P2X2 en las motoneuronas faciales se ve incrementada, tras una lesión del nervio facial (162). El incremento en la expresión del P2X1 es me-

nos marcado y menos persistente en los ratones, modelo de ELA, con la superóxido dismutasa 1 mutada. Una disminución en la liberación de ATP en respuesta al daño en las motoneuronas podría explicar esta baja inducción del P2X1 en los ratones mutados (162).

Isquemia/hipoxia

En varios sistemas celulares se ha descrito una participación directa del ATP extracelular y los receptores P2 en el estrés isquémico. Por ejemplo, en cultivos organotípicos de hipocampo, corteza y estriado se observa un incremento en la expresión de los receptores P2X2 y P2X4 en condiciones de deprivación de oxígeno/glucosa (163). La expresión del receptor P2X1 también se incrementa en estructuras correspondientes a las fibras musgosas y las colaterales de Schaffer de CA1-3 y el giro dentado en el modelo organotípico de hipocampo (164). El uso de antagonistas de los receptores P2 previene la pérdida de neuronas inducida por las condiciones isquémicas en los cultivos organotípicos (163, 164). Un incremento en la expresión de los receptores P2X2 y P2X4 se observa también en el hipocampo de gerbos sometidos a una oclusión bilateral de las carótidas, un modelo ampliamente utilizado para el estudio de las lesiones isquémicas cerebrales. (163).

Aunque estudios iniciales habían mostrado que la deleción del receptor P2X7 (en ratones knockout) y/o el tratamiento con el antagonista P2X7, KN-62, no afectaba a la muerte celular inducida por isquemia (165); otros ensayos, sin embargo, han aportado datos que sugieren que este receptor podría ser un elemento importante en los mecanismos de daño celular por hipoxia/isquemia: tras la estimulación isquémica se observa un incremento en la expresión (a nivel de ARNm y proteína) del P2X7 en neuronas granulares de cerebelo en cultivo y en cultivos organotípicos de hipocampo (166, 167). También se observa un incremento en la expresión del P2X7 en neuronas y células gliales de la corteza cerebral de ratas espontáneamente hipertensas usando un modelo de isquemia cerebral focal permanente (168). En cultivos celulares cerebrocorticales, la isquemia conduce a una hipersensibilización (debida a un incremento en la eficiencia de sus vías de transducción de señal) del receptor P2X7, que se traduce en un incremento en la liberación de GABA inducida por BzATP (169). Un incremento en el ARNm del P2X7, asignado únicamente a la microglía, se observa en el tejido que rodea al área necrosada como consciencia de una oclusión de la arteria cerebral media (69). Asimismo, receptores P2X7 y P2X4 de la microglía podrían estar implicados en el daño cortical inducido por la deprivación de oxígeno/glucosa (170).

Trauma

El daño celular, como se ha mencionado previamente, libera grandes cantidades de ATP al medio extracelular, lo que puede ser importante para impulsar las respuestas celulares al trauma. Así, por ejemplo, empleando un modelo *in vitro* de trauma que induce la liberación de ATP, se ha podido comprobar que este ATP liberado, activando receptores P2Y₄, estimula la síntesis y secreción de trombospondina-1 en los astrocitos. La trombospondina es una molécula de la matriz extracelular que induce la formación de sinapsis durante el desarrollo y puede tener un papel en la reparación y el remodelado del tejido nervioso tras un daño (171).

El ATP liberado de los astrocitos es esencial en la respuesta defensiva de la microglía inducida por una lesión traumática del cerebro, contribuyendo a establecer una barrera potencial entre el tejido sano y el dañado (138). El receptor P2Y₁₂ y probablemente también el P2X4 estimulan la migración y quimiotaxis de la microglía hacia el sitio del daño tras un trauma cerebral (139, 140), donde la microglía en reposo se transforma en su forma activada, efecto que es inducido *in vitro* por el ATP (141). Asimismo, tras un daño tisular, el receptor P2Y₆ incrementa su expresión en las células microgliales, donde estimula la actividad fagocitótica, ayudando así a limitar el daño secundario mediante la eliminación de células muertas y residuos potencialmente peligrosos (172). La microglía activada también muestra cambios significativos en la expresión del receptor P2X7, el cual puede jugar un papel importante en el control de la proliferación y muerte de las células microgliales (173).

Tras un daño neuronal, el ATP puede actuar también en combinación con los factores de crecimiento derivados de fibroblastos, epidermis y plaquetas, así como con el factor de crecimiento neural, liberado por las neuronas o células gliales, para estimular la proliferación de los astrocitos, contribuyendo así al proceso de astrogliosis reactiva (174). El factor de transcripción STAT3 y la ciclo-oxigenasa 2 podrían participar en los mecanismos de señalización intracelular activados por el ATP para inducir la proliferación de los astrocitos (175, 176).

Un nuevo mecanismo para la inhibición de la apoptosis en neuroprotección implica la interacción de dos sistemas actuando en paralelo: por un lado, el ATP extracelular, a través de la activación de receptores P2Y₂ y, por otro lado la neurotrofina, actuando a través de receptores TrkA (177). El receptor P2Y₂, mediante la regulación de la expresión de genes pro- y anti-apoptóticos, activa mecanismos neuroprotectores en los astrocitos (178). Finalmente, el número de neuronas y células gliales positivas para el receptor P2Y₁ en el núcleo accumbens se incrementa significativamente tras una lesión (179).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los receptores de nucleótidos son muy abundantes en el SNC, donde están presentes en todos los tipos de células neurales. A pesar de que sus papeles fisiológicos están todavía muy lejos de ser completamente elucidados y de que solo disponemos de información en muchos casos fragmentaria, existen sin embargo evidencias de que estos receptores están implicados en diferentes desórdenes y condiciones patológicas del SNC. En los últimos años se ha hecho un considerable esfuerzo para sintetizar ligandos potentes y selectivos de los receptores P2. Estos compuestos, aparte de ser importantes herramientas farmacológicas para la caracterización de los papeles fisiopatológicos de los receptores P2X y P2Y, podrían representar nuevas herramientas terapéuticas con interés potencial en varias enfermedades neurológicas humanas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Burnstock, G.; Campbell, G.; Satchell, D. y Smythe, A. (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.* 40: 668-688.
- (2) Burnstock, G. (1976) Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience*. 1: 239-248.
- (3) Jahr, C.E. y Jessell, T.M. (1983) ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature*, 304: 730-733.
- (4) Chen, C.C.; Akopian, A.N.; Sivilotti, L.; Colquhoun, D.; Burnstock, G. y Wood, J.N. (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*. 377: 428-431.
- (5) EDWARDS, F.A.; GIBB, A.J. Y COLQUHOUN, D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*. 359: 144-147.
- (6) BARDONI, R.; GOLDSTEIN, P.A.; LEE, C.J.; GU, J.G. Y MACDERMOTT, A.B. (1997) ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 17: 5297-5304.
- (7) Pankratov, Y.; Castro, E.; Miras-Portugal, M.T. y Krishtal, O. (1998) A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 10: 3898-3902.
- (8) Lustig, K.D.; Shiau, A.K.; Brake, A.J. y Julius, D. (1993) Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 90: 5113-5117.

- (9) VALERA, S.; HUSSY, N.; EVANS, R.J.; ADAMI, N.; NORTH, R.A.; SURPRENANT, A. Y BUELL, G. (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature*. 371: 516-519.
- (10) Burnstock, G. (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 575-590.
- (11) Burnstock, G. (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87: 659-797.
- (12) Pankratov, Y.; Lalo, U.; Verkhratsky, A. y North, R.A. (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers*. *Arch*. 452: 589-597.
- (13) GUALIX, J.; PINTOR, J. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (1999) Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 73: 1098-1104.
- (14) GUALIX, J.; ABAL, M.; PINTOR, J.; GARCIA-CARMONA, F. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (1996) Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J. Biol. Chem.* 271: 1957-1965.
- (15) ZIMMERMANN, H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362: 299-309.
- (16) Burnstock, G. (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64: 1471-1483.
- (17) Collingridge, G.L.; Olsen, R.W.; Peters, J. y Spedding, M. (2008) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.063.
- (18) VIAL, C.; ROBERTS, J.A. Y EVANS, R.J. (2004) Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 25: 487-493.
- (19) NORTH, R.A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82: 1013-1067.
- (20) Simon, J.; Kidd, E.J.; Smith, F.M.; Chessell, I.P.; Murrell-Lagnado, R.; Humphrey, P.P. y Barnard, E.A. (1997) Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor. *Mol. Pharmacol.* 52: 237-248.
- (21) Thunberg, U.; Tobin, G.; Johnson, A.; Soderberg, O.; Padyukov, L.; Hultdin, M.; Klareskog, L.; Enblad, G.; Sundstrom, C.; Roos, G. y Rosenquist, R. (2002) Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 360: 1935-1939.
- (22) Dani, J.A. y Mayer, M.L. (1995) Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 310-317.
- (23) Kim, M.; Jiang, L.H.; Wilson, H.L.; North, R.A. y Surprenant, A. (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *Embo J*. 20: 6347-6358.

- (24) Ennion, S.J. Y Evans, R.J. (2002) Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol. Pharmacol.* 61: 303-311.
- (25) CLYNE, J.D.; LAPOINTE, L.D. Y HUME, R.I. (2002) The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *J. Physiol.* 539: 347-359.
- (26) Rettinger, J.; Aschrafi, A. y Schmalzing, G. (2000) Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 33542-33547.
- (27) NICKE, A.; BAUMERT, H.G.; RETTINGER, J.; EICHELE, A.; LAMBRECHT, G.; MUTSCHLER, E. Y SCHMALZING, G. (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J.* 17: 3016-3028.
- (28) Stoop, R.; Thomas, S.; Rassendren, F.; Kawashima, E.; Buell, G.; Surprenant, A. y North, R.A. (1999) Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol. Pharmacol.* 56: 973-981.
- (29) DING, S. Y SACHS, F. (1999) Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J. Gen. Physiol.* 113: 695-720.
- (30) BARRERA, N.P.; ORMOND, S.J.; HENDERSON, R.M.; MURRELL-LAGNADO, R.D. Y EDWARDSON, J.M. (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J. Biol. Chem.* 280: 10759-10765.
- (31) King, B.F.; Townsend-Nicholson, A.; Wildman, S.S.; Thomas, T.; Spyer, K.M. y Burnstock, G. (2000) Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in Xenopus oocytes. *J. Neurosci.* 20: 4871-4877.
- (32) GEVER, J.R.; COCKAYNE, D.A.; DILLON, M.P.; BURNSTOCK, G. Y FORD, A.P. (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 452: 513-537.
- (33) Torres, G.E.; Egan, T.M. y Voigt, M.M. (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* 274: 6653-6659.
- (34) JARVIS, M.F. Y KHAKH, B.S. (2008) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.067.
- (35) Egan, T.M.; Samways, D.S. y Li, Z. (2006) Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452: 501-512.
- (36) Egan, T.M. y Khakh, B.S. (2004) Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J. Neurosci.* 24: 3413-3420.
- (37) Erb, L.; Liao, Z.; Seye, C.I. y Weisman, G.A. (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452: 552-562.

- (38) LEON, D.; HERVAS, C. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2006) P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* 23: 2999-3013.
- (39) LOCOVEI, S.; SCEMES, E.; QIU, F.; SPRAY, D.C. Y DAHL, G. (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett.* 581: 483-488.
- (40) Lewis, C.; Neidhart, S.; Holy, C.; North, R.A.; Buell, G. y Surprenant, A. (1995) Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature*. 377: 432-435.
- (41) King, B.F.; Liu, M.; Pintor, J.; Gualix, J.; Miras-Portugal, M.T. y Burnstock, G. (1999) Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 128: 981-988.
- (42) Donnelly-Roberts, D.L. y Jarvis, M.F. (2007) Discovery of P2X(7) receptor-selective antagonists offers new insights into P2X(7) receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br. J. Pharmacol.* 151: 571-579.
- (43) LAGERSTROM, M.C. Y SCHIOTH, H.B. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 339-357.
- (44) ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J.M.; BARNARD, E.A.; BOYER, J.L.; KENNEDY, C.; KNIGHT, G.E.; FUMAGALLI, M.; GACHET, C.; JACOBSON, K.A. Y WEISMAN, G.A. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58: 281-341.
- (45) VON KUGELGEN, I. (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* 110: 415-432.
- (46) BARNARD, E.A.; BURNSTOCK, G. Y WEBB, T.E. (1994) G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 67-70.
- (47) BOUVIER, M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 274-286.
- (48) Kotevic, I.; Kirschner, K.M.; Porzig, H. y Baltensperger, K. (2005) Constitutive interaction of the P2Y2 receptor with the hematopoietic cell-specific G protein G(alpha16) and evidence for receptor oligomers. *Cell. Signal.* 17: 869-880.
- (49) ECKE, D.; HANCK, T.; TULAPURKAR, M.E.; SCHAFER, R.; KASSACK, M.; STRICKER, R. Y REISER, G. (2008) Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor. *Biochem. J.* 409: 107-116.
- (50) Suzuki, T.; Namba, K.; Tsuga, H. y Nakata, H. (2006) Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A1 adenosine receptor and P2Y2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351: 559-565.

- (51) Yoshioka, K. y Nakata, H. (2004) ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: purinergic receptor complex: generating adenine nucleotide-sensitive adenosine receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 94: 88-94.
- (52) Purkiss, J.R. y Boarder, M.R. (1992) Stimulation of phosphatidate synthesis in endothelial cells in response to P2-receptor activation. Evidence for phospholipase C and phospholipase D involvement, phosphatidate and diacylglycerol interconversion and the role of protein kinase C. *Biochem. J.* 287 (Pt 1): 31-36.
- (53) Mateo, J.; Miras-Portugal, M.T. y Castro, E. (1996) Co-existence of P2Y-and PPADS-insensitive P2U-purinoceptors in endothelial cells from adrenal medulla. *Br. J. Pharmacol.* 119: 1223-1232.
- (54) Kunapuli, S.P. y Daniel, J.L. (1998) P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* 336 (Pt 3): 513-523.
- (55) Delicado, E.G.; Jimenez, A.I.; Carrasquero, L.M.; Castro, E. y Miras-Portugal, M.T. (2005) Cross-talk among epidermal growth factor, Ap(5)A, and nucleotide receptors causing enhanced ATP Ca(2+) signaling involves extracellular kinase activation in cerebellar astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 81: 789-796.
- (56) PATEL, V.; BROWN, C.; GOODWIN, A.; WILKIE, N. Y BOARDER, M.R. (1996) Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production. *Biochem. J.* 320 (Pt 1): 221-226.
- (57) Garcia, A.; Shankar, H.; Murugappan, S.; Kim, S. y Kunapuli, S.P. (2007) Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets. *Biochem. J.* 404: 299-308.
- (58) KATZ, S.; BOLAND, R. Y SANTILLAN, G. (2006) Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38: 2082-2091.
- (59) NEARY, J.T. Y KANG, Y. (2006) P2 purinergic receptors signal to glycogen synthase kinase-3beta in astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 84: 515-524.
- (60) ORTEGA, F.; PEREZ-SEN, R. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2008) Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons. *J. Neurochem.* 104: 62-73.
- (61) Collo, G.; North, R.A.; Kawashima, E.; Merlo-Pich, E.; Neidhart, S.; Surpre-Nant, A. y Buell, G. (1996) Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci.* 16: 2495-2507.

- (62) Vulchanova, L.; Arvidsson, U.; Riedl, M.; Wang, J.; Buell, G.; Surprenant, A.; North, R.A. y Elde, R. (1996) Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 8063-8067.
- (63) ATKINSON, L.; BATTEN, T.F. Y DEUCHARS, J. (2000) P2X(2) receptor immunoreactivity in the dorsal vagal complex and area postrema of the rat. *Neuroscience*. 99: 683-696.
- (64) VULCHANOVA, L.; RIEDL, M.S.; SHUSTER, S.J.; BUELL, G.; SURPRENANT, A.; NORTH, R.A. Y ELDE, R. (1997) Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology.* 36: 1229-1242.
- (65) RODRIGUES, R.J.; ALMEIDA, T.; RICHARDSON, P.J.; OLIVEIRA, C.R. Y CUNHA, R.A. (2005) Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 receptors in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 25: 6286-6295.
- (66) PAPP, L.; BALAZSA, T.; KOFALVI, A.; ERDELYI, F.; SZABO, G.; VIZI, E.S. Y SPERLAGH, B. (2004) P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310: 973-980.
- (67) LE, K.T.; VILLENEUVE, P.; RAMJAUN, A.R.; MCPHERSON, P.S.; BEAUDET, A. Y SEGUELA, P. (1998) Sensory presynaptic and widespread somatodendritic immunolocalization of central ionotropic P2X ATP receptors. *Neuroscience*. 83: 177-190.
- (68) YAO, S.T.; BARDEN, J.A. Y LAWRENCE, A.J. (2001) On the immunohistochemical distribution of ionotropic P2X receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neuroscience*. 108: 673-685.
- (69) Collo, G.; Neidhart, S.; Kawashima, E.; Kosco-Vilbois, M.; North, R.A. y Buell, G. (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 36: 1277-1283.
- (70) Yu, Y.; Ugawa, S.; Ueda, T.; Ishida, Y.; Inoue, K.; Kyaw Nyunt, A.; Umemura, A.; Mase, M.; Yamada, K. y Shimada, S. (2007) Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res.* 1194: 45-55.
- (71) Hervas, C.; Perez-Sen, R. y Miras-Portugal, M.T. (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.* 73: 384-399.
- (72) ATKINSON, L.; BATTEN, T.F.; MOORES, T.S.; VAROQUI, H.; ERICKSON, J.D. Y DEUCHARS, J. (2004) Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. *Neuroscience*. 123: 761-768.

- (73) DEUCHARS, S.A.; ATKINSON, L.; BROOKE, R.E.; MUSA, H.; MILLIGAN, C.J.; BATTEN, T.F.; BUCKLEY, N.J.; PARSON, S.H. Y DEUCHARS, J. (2001) Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* 21: 7143-7152.
- (74) Hervas, C.; Perez-Sen, R. y Miras-Portugal, M.T. (2005) Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochem. Pharmacol.* 70: 770-785.
- (75) Sperlagh, B.; Kofalvi, A.; Deuchars, J.; Atkinson, L.; Milligan, C.J.; Buckley, N.J. y Vizi, E.S. (2002) Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 81: 1196-1211.
- (76) Pankratov, Y.; Lalo, U.; Krishtal, O. y Verkhratsky, A. (2002) Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. *J. Physiol.* 542: 529-536.
- (77) MORI, M.; HEUSS, C.; GAHWILER, B.H. Y GERBER, U. (2001) Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J. Physiol.* 535: 115-123.
- (78) NIEBER, K.; POELCHEN, W. Y ILLES, P. (1997) Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurones of the rat. *Br. J. Pharmacol*. 122: 423-430.
- (79) Cunha, R.A. y Ribeiro, J.A. (2000) ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci.* 68: 119-137.
- (80) Engelman, H.S. y MacDermott, A.B. (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 135-145.
- (81) DIAZ-HERNANDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2002) Colocalisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology*. 42: 20-33.
- (82) Gualix, J.; Gomez-Villafuertes, R.; Diaz-Hernandez, M. y Miras-Portugal, M.T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J. Neurochem.* 87: 160-171.
- (83) Gomez-Villafuertes, R.; Gualix, J. y Miras-Portugal, M.T. (2001) Single GA-BAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J. Neurochem.* 77: 84-93.
- (84) DIAZ-HERNANDEZ, M.; GOMEZ-VILLAFUERTES, R.; HERNANDO, F.; PINTOR, J. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2001) Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X(3) subunits. *Neurosci. Lett.* 301: 159-162.

- (85) MIRAS-PORTUGAL, M.T.; DIAZ-HERNANDEZ, M.; GIRALDEZ, L.; HERVAS, C.; GOMEZ-VI-LLAFUERTES, R.; SEN, R.P.; GUALIX, J. Y PINTOR, J. (2003) P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem. Res.* 28: 1597-1605.
- (86) Ashour, F. y Deuchars, J. (2004) Electron microscopic localisation of P2X4 receptor subunit immunoreactivity to pre- and post-synaptic neuronal elements and glial processes in the dorsal vagal complex of the rat. *Brain Res.* 1026: 44-55.
- (87) Gu, J.G. y MacDermott, A.B. (1997) Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature*. 389: 749-753.
- (88) Khakh, B.S.; Gittermann, D.; Cockayne, D.A. y Jones, A. (2003) ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J. Neurosci.* 23: 7426-7437.
- (89) Shigetomi, E. y Kato, F. (2004) Action potential-independent release of glutamate by Ca2+ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J. Neurosci.* 24: 3125-3135.
- (90) Kato, F. Y Shigetomi, E. (2001) Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J. Physiol.* 530: 469-486.
- (91) PAPP, L.; VIZI, E.S. Y SPERLAGH, B. (2004) Lack of ATP-evoked GABA and glutamate release in the hippocampus of P2X7 receptor-/- mice. *Neuroreport*. 15: 2387-2391.
- (92) Hugel, S. Y Schlichter, R. (2000) Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *J. Neurosci.* 20: 2121-2130.
- (93) RHEE, J.S.; WANG, Z.M.; NABEKURA, J.; INOUE, K. Y AKAIKE, N. (2000) ATP facilitates spontaneous glycinergic IPSC frequency at dissociated rat dorsal horn interneuron synapses. *J. Physiol.* 524 Pt 2: 471-483.
- (94) Wang, Z.M.; Katsurabayashi, S.; Rhee, J.S.; Brodwick, M. y Akaike, N. (2001) Substance P abolishes the facilitatory effect of ATP on spontaneous glycine release in neurons of the trigeminal nucleus pars caudalis. *J. Neurosci.* 21: 2983-2991.
- (95) Khakh, B.S.; Zhou, X.; Sydes, J.; Galligan, J.J. y Lester, H.A. (2000) State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature*. 406: 405-410.
- (96) DIAZ-HERNANDEZ, M.; SANCHEZ-NOGUEIRO, J. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2006) Role of CaCMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J. Mol. Neurosci.* 30: 177-180.
- (97) PINTOR, J.; GUALIX, J. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (1997) Dinucleotide receptor modulation by protein kinases (protein kinases A and C) and protein phosphatases in rat brain synaptic terminals. *J. Neurochem.* 68: 2552-2557.

- (98) GOMEZ-VILLAFUERTES, R.; PINTOR, J.; GUALIX, J. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2003) GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes. *Neuropharmacology*. 44: 311-323.
- (99) Moore, D.J.; Chambers, J.K.; Wahlin, J.P.; Tan, K.B.; Moore, G.B.; Jenkins, O.; Emson, P.C. y Murdock, P.R. (2001) Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1521: 107-119.
- (100) Moore, D.; Chambers, J.; Waldvogel, H.; Faull, R. y Emson, P. (2000) Regional and cellular distribution of the P2Y(1) purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation. *J. Comp. Neurol.* 421: 374-384.
- (101) HOLLOPETER, G.; JANTZEN, H.M.; VINCENT, D.; LI, G.; ENGLAND, L.; RAMAKRISHNAN, V.; YANG, R.B.; NURDEN, P.; NURDEN, A.; JULIUS, D. Y CONLEY, P.B. (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 409: 202-207.
- (102) Communi, D.; Gonzalez, N.S.; Detheux, M.; Brezillon, S.; Lannoy, V.; Parmentier, M. y Boeynaems, J.M. (2001) Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J. Biol. Chem.* 276: 41479-41485.
- (103) FUMAGALLI, M.; BRAMBILLA, R.; D'AMBROSI, N.; VOLONTE, C.; MATTEOLI, M.; VERDERIO, C. Y ABBRACCHIO, M.P. (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia.* 43: 218-203.
- (104) FILIPPOV, A.K.; SIMON, J.; BARNARD, E.A. Y BROWN, D.A. (2003) Coupling of the nucleotide P2Y4 receptor to neuronal ion channels. *Br. J. Pharmacol.* 138: 400-406.
- (105) FILIPPOV, A.K.; WEBB, T.E.; BARNARD, E.A. Y BROWN, D.A. (1999) Dual coupling of heterologously-expressed rat P2Y6 nucleotide receptors to N-type Ca2+ and M-type K+ currents in rat sympathetic neurones. *Br. J. Pharmacol.* 126: 1009-1017.
- (106) FILIPPOV, A.K.; WEBB, T.E.; BARNARD, E.A. Y BROWN, D.A. (1998) P2Y2 nucleotide receptors expressed heterologously in sympathetic neurons inhibit both N-type Ca2+ and M-type K+ currents. *J. Neurosci.* 18: 5170-5179.
- (107) FILIPPOV, A.K.; BROWN, D.A. Y BARNARD, E.A. (2000) The P2Y(1) receptor closes the N-type Ca(2+) channel in neurones, with both adenosine triphosphates and diphosphates as potent agonists. *Br. J. Pharmacol.* 129: 1063-1066.
- (108) Gerevich, Z.; Borvendeg, S.J.; Schroder, W.; Franke, H.; Wirkner, K.; Norenberg, W.; Furst, S.; Gillen, C. y Illes, P. (2004) Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion neurons by P2Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. *J. Neurosci.* 24: 797-807.
- (109) Kulick, M.B. y von Kugelgen, I. (2002) P2Y-receptors mediating an inhibition of the evoked entry of calcium through N-type calcium channels at neuronal processes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 520-526.

- (110) Lechner, S.G.; Dorostkar, M.M.; Mayer, M.; Edelbauer, H.; Pankevych, H. y Boehm, S. (2004) Autoinhibition of transmitter release from PC12 cells and sympathetic neurons through a P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-gated Ca2+ channels. *Eur. J. Neurosci.* 20: 2917-2928.
- (111) WIRKNER, K.; SCHWEIGEL, J.; GEREVICH, Z.; FRANKE, H.; ALLGAIER, C.; BARSOU-MIAN, E.L.; DRAHEIM, H. Y ILLES, P. (2004) Adenine nucleotides inhibit recombinant N-type calcium channels via G protein-coupled mechanisms in HEK 293 cells; involvement of the P2Y13 receptor-type. *Br. J. Pharmacol.* 141: 141-151.
- (112) FILIPPOV, A.K. Y BROWN, D.A. (1996) Activation of nucleotide receptors inhibits high-threshold calcium currents in NG108-15 neuronal hybrid cells. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1149-1155.
- (113) DAVE, S. Y MOGUL, D.J. (1996) ATP receptor activation potentiates a voltage-dependent Ca channel in hippocampal neurons. *Brain Res.* 715: 208-216.
- (114) Hussl, S. y Boehm, S. (2006) Functions of neuronal P2Y receptors. *Pflugers Arch*. 452: 538-551.
- (115) IKEUCHI, Y. Y NISHIZAKI, T. (1995) ATP-evoked potassium currents in rat striatal neurons are mediated by a P2 purinergic receptor. *Neurosci. Lett.* 190: 89-92.
- (116) Wirkner, K.; Koles, L.; Thummler, S.; Luthardt, J.; Poelchen, W.; Franke, H.; Furst, S. y Illes, P. (2002) Interaction between P2Y and NMDA receptors in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology*. 42: 476-488.
- (117) LUTHARDT, J.; BORVENDEG, S.J.; SPERLAGH, B.; POELCHEN, W.; WIRKNER, K. Y ILLES, P. (2003) P2Y(1) receptor activation inhibits NMDA receptor-channels in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal and parietal cortex. *Neurochem. Int.* 42: 161-172.
- (118) Ortinau, S.; Laube, B. y Zimmermann, H. (2003) ATP inhibits NMDA receptors after heterologous expression and in cultured hippocampal neurons and attenuates NMDA-mediated neurotoxicity. *J. Neurosci.* 23: 4996-5003.
- (119) Moriyama, T.; Iida, T.; Kobayashi, K.; Higashi, T.; Fukuoka, T.; Tsumura, H.; Leon, C.; Suzuki, N.; Inoue, K.; Gachet, C.; Noguchi, K. y Tominaga, M. (2003) Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J. Neurosci.* 23: 6058-6062.
- (120) VIAL, C.; TOBIN, A.B. Y EVANS, R.J. (2004) G-protein-coupled receptor regulation of P2X1 receptors does not involve direct channel phosphorylation. *Biochem. J.* 382: 101-110.
- (121) Gerevich, Z.; Muller, C. y Illes, P. (2005) Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 521: 34-38.

- (122) VON KUGELGEN, I.; SPATH, L. Y STARKE, K. (1994) Evidence for P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat brain cortex. *Br. J. Pharmacol.* 113: 815-822.
- (123) VON KUGELGEN, I.; KOCH, H. Y STARKE, K. (1997) P2-receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Neuropharmacology*. 36: 1221-1227.
- (124) Mendoza-Fernandez, V.; Andrew, R.D. y Barajas-Lopez, C. (2000) ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293: 172-179.
- (125) PRICE, G.D.; ROBERTSON, S.J. Y EDWARDS, F.A. (2003) Long-term potentiation of glutamatergic synaptic transmission induced by activation of presynaptic P2Y receptors in the rat medial habenula nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 17: 844-850.
- (126) NAKAMURA, F. Y STRITTMATTER, S.M. (1996) P2Y1 purinergic receptors in sensory neurons: contribution to touch-induced impulse generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 93: 10465-10470.
- (127) Newman, E.A. (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci*. 26: 536-542.
- (128) Carrasquero, L.M.; Delicado, E.G.; Jimenez, A.I.; Perez-Sen, R. y Miras-Portugal, M.T. (2005) Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y(13)-like receptors. *Purinergic Signal*. 1: 153-159.
- (129) JIMENEZ, A.I.; CASTRO, E.; COMMUNI, D.; BOEYNAEMS, J.M.; DELICADO, E.G. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2000) Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes. *J. Neurochem.* 75: 2071-2079.
- (130) Cotrina, M.L.; Lin, J.H.; Lopez-Garcia, J.C.; Naus, C.C. y Nedergaard, M. (2000) ATP-mediated glia signaling. *J. Neurosci.* 20: 2835-2844.
- (131) FAM, S.R.; GALLAGHER, C.J.; KALIA, L.V. Y SALTER, M.W. (2003) Differential frequency dependence of P2Y1- and P2Y2- mediated Ca 2+ signaling in astrocytes. *J. Neurosci.* 23: 4437-4444.
- (132) Duan, S.; Anderson, C.M.; Keung, E.C.; Chen, Y.; Chen, Y. y Swanson, R.A. (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* 23: 1320-1328.
- (133) Innocenti, B.; Parpura, V. y Haydon, P.G. (2000) Imaging extracellular waves of glutamate during calcium signaling in cultured astrocytes. *J. Neurosci.* 20: 1800-1808.
- (134) Wang, C.M.; Chang, Y.Y.; Kuo, J.S. y Sun, S.H. (2002) Activation of P2X(7) receptors induced [(3)H]GABA release from the RBA-2 type-2 astrocyte cell line through a Cl(-)/HCO(3)(-)-dependent mechanism. *Glia*. 37: 8-18.

- (135) Kang, J.; Jiang, L.; Goldman, S.A. y Nedergaard, M. (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 1: 683-692.
- (136) Kreutzberg, G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 19: 312-318.
- (137) Hanisch, U.K. (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 40: 140-155.
- (138) DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J.V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D.R.; DUSTIN, M.L. Y GAN, W.B. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8: 752-758.
- (139) HAYNES, S.E.; HOLLOPETER, G.; YANG, G.; KURPIUS, D.; DAILEY, M.E.; GAN, W.B. Y JULIUS, D. (2006) The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9: 1512-1519.
- (140) Ohsawa, K.; Irino, Y.; Nakamura, Y.; Akazawa, C.; Inoue, K. y Kohsaka, S. (2007) Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia*. 55: 604-616.
- (141) XIANG, Z.; CHEN, M.; PING, J.; DUNN, P.; LV, J.; JIAO, B. Y BURNSTOCK, G. (2006) Microglial morphology and its transformation after challenge by extracellular ATP in vitro. *J. Neurosci. Res.* 83: 91-101.
- (142) McLarnon, J.G. (2005) Purinergic mediated changes in Ca2+ mobilization and functional responses in microglia: effects of low levels of ATP. *J. Neurosci. Res.* 81: 349-356.
- (143) SKAPER, S.D.; FACCI, L.; CULBERT, A.A.; EVANS, N.A.; CHESSELL, I.; DAVIS, J.B. Y RICHARDSON, J.C. (2006) P2X(7) receptors on microglial cells mediate injury to cortical neurons in vitro. *Glia*. 54: 234-242.
- (144) Gendron, F.P.; Chalimoniuk, M.; Strosznajder, J.; Shen, S.; Gonzalez, F.A.; Weisman, G.A. y Sun, G.Y. (2003) P2X7 nucleotide receptor activation enhances IFN gamma-induced type II nitric oxide synthase activity in BV-2 microglial cells. *J. Neurochem.* 87: 344-352.
- (145) BIANCO, F.; PRAVETTONI, E.; COLOMBO, A.; SCHENK, U.; MOLLER, T.; MATTEOLI, M. Y VERDERIO, C. (2005) Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J. Immunol.* 174: 7268-7277.
- (146) TSUDA, M.; SHIGEMOTO-MOGAMI, Y.; KOIZUMI, S.; MIZOKOSHI, A.; KOHSAKA, S.; SALTER, M.W. Y INOUE, K. (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 424: 778-783.
- (147) Zhang, Y.X.; Yamashita, H.; Ohshita, T.; Sawamoto, N. y Nakamura, S. (1995) ATP increases extracellular dopamine level through stimulation of P2Y purinoceptors in the rat striatum. *Brain Res.* 691: 205-212.

- (148) GIRALDEZ, L.; DIAZ-HERNANDEZ, M.; GOMEZ-VILLAFUERTES, R.; PINTOR, J.; CASTRO, E. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2001) Adenosine triphosphate and diadenosine pentaphosphate induce [Ca(2+)](i) increase in rat basal ganglia aminergic terminals. *J. Neurosci. Res.* 64: 174-182.
- (149) Amadio, S.; Montilli, C.; Picconi, B.; Calabresi, P. y Volonte, C. (2007) Mapping P2X and P2Y receptor proteins in striatum and substantia nigra: An immunohistological study. *Purinergic Signal*. 3: 389-398.
- (150) Morales, I.; Dopico, J.G.; Sabate, M.; Gonzalez-Hernandez, T. y Rodriguez, M. (2007) Substantia nigra osmoregulation: taurine and ATP involvement. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292: C1934-1941.
- (151) PINTOR, J.; DIAZ-HERNANDEZ, M.; GUALIX, J.; GOMEZ-VILLAFUERTES, R.; HERNANDO, F. Y MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2000) Diadenosine polyphosphate receptors. from rat and guinea-pig brain to human nervous system. *Pharmacol. Ther.* 87: 103-115.
- (152) WANG, Y.; CHANG, C.F.; MORALES, M.; CHIANG, Y.H.; HARVEY, B.K.; SU, T.P.; TSAO, L.I.; CHEN, S. Y THIEMERMANN, C. (2003) Diadenosine tetraphosphate protects against injuries induced by ischemia and 6-hydroxydopamine in rat brain. *J. Neurosci.* 23: 7958-7965.
- (153) AKIYAMA, H.; BARGER, S.; BARNUM, S.; BRADT, B.; BAUER, J.; COLE, G.M.; COOPER, N.R.; EIKELENBOOM, P.; EMMERLING, M.; FIEBICH, B.L.; FINCH, C.E.; FRAUTSCHY, S.; GRIFFIN, W.S.; HAMPEL, H.; HULL, M.; LANDRETH, G.; LUE, L.; MRAK, R.; MACKENZIE, I.R.; MCGEER, P.L.; O'BANION, M.K.; PACHTER, J.; PASINETTI, G.; PLATA-SALAMAN, C.; ROGERS, J.; RYDEL, R.; SHEN, Y.; STREIT, W.; STROHMEYER, R.; TOOYOMA, I.; VAN MUISWINKEL, F.L.; VEERHUIS, R.; WALKER, D.; WEBSTER, S.; WEGRZYNIAK, B.; WENK, G. Y WYSS-CORAY, T. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 21: 383-421.
- (154) Xu, J.; Chalimoniuk, M.; Shu, Y.; Simonyi, A.; Sun, A.Y.; Gonzalez, F.A.; Weisman, G.A.; Wood, W.G. y Sun, G.Y. (2003) Prostaglandin E2 production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 69: 437-448.
- (155) McLarnon, J.G.; Ryu, J.K.; Walker, D.G. y Choi, H.B. (2006) Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65: 1090-1097.
- (156) PARVATHENANI, L.K.; TERTYSHNIKOVA, S.; GRECO, C.R.; ROBERTS, S.B.; ROBERTSON, B. Y POSMANTUR, R. (2003) P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 278: 13309-13317.

- (157) RAMPE, D.; WANG, L. Y RINGHEIM, G.E. (2004) P2X7 receptor modulation of beta-amyloid- and LPS-induced cytokine secretion from human macrophages and microglia. *J. Neuroimmunol.* 147: 56-61.
- (158) Moore, D.; Iritani, S.; Chambers, J. y Emson, P. (2000) Immunohistochemical localization of the P2Y1 purinergic receptor in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 11: 3799-3803.
- (159) CAMDEN, J.M.; SCHRADER, A.M.; CAMDEN, R.E.; GONZALEZ, F.A.; ERB, L.; SEYE, C.I. Y WEISMAN, G.A. (2005) P2Y2 nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J. Biol. Chem.* 280: 18696-18702.
- (160) DIEZ-ZAERA, M.; DIAZ-HERNANDEZ, M.; ALBERCH, J.; MIRAS-PORTUGAL, M.T. Y Lucas J.J. (2007) Purinergic system in Huntington's disease: Develop of new therapeutic strategies. *J. Neurochem.* 101(Suppl. 1): 66.
- (161) Andries, M.; Van Damme, P.; Robberecht, W. y Van Den Bosch, L. (2007) Ivermectin inhibits AMPA receptor-mediated excitotoxicity in cultured motor neurons and extends the life span of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 25: 8-16.
- (162) Kassa, R.M.; Bentivoglio, M. y Mariotti, R. (2007) Changes in the expression of P2X1 and P2X2 purinergic receptors in facial motoneurons after nerve lesions in rodents and correlation with motoneuron degeneration. *Neurobiol. Dis.* 25: 121-133.
- (163) CAVALIERE, F.; FLORENZANO, F.; AMADIO, S.; FUSCO, F.R.; VISCOMI, M.T.; D'AMBROSI, N.; VACCA, F.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G.; MOLINARI, M. Y VOLONTE, C. (2003) Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. *Neuroscience*. 120: 85-98.
- (164) CAVALIERE, F.; AMADIO, S.; DINKEL, K.; REYMANN, K.G. Y VOLONTE, C. (2007) P2 receptor antagonist trinitrophenyl-adenosine-triphosphate protects hippocampus from oxygen and glucose deprivation cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323: 70-77.
- (165) Le Feuvre, R.A.; Brough, D.; Touzani, O. y Rothwell, N.J. (2003) Role of P2X7 receptors in ischemic and excitotoxic brain injury in vivo. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 23: 381-384.
- (166) CAVALIERE, F.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G. Y VOLONTE, C. (2002) Extracellular ATP and nerve growth factor intensify hypoglycemia-induced cell death in primary neurons: role of P2 and NGFRp75 receptors. *J. Neurochem.* 83: 1129-1138.
- (167) CAVALIERE, F.; AMADIO, S.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G. Y VOLONTE, C. (2004) Synaptic P2X7 and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24: 392-398.
- (168) Franke, H.; Gunther, A.; Grosche, J.; Schmidt, R.; Rossner, S.; Reinhardt, R.; Faber-Zuschratter, H.; Schneider, D. y Illes, P. (2004) P2X7 receptor expres-

- sion after ischemia in the cerebral cortex of rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63: 686-699.
- (169) WIRKNER, K.; KOFALVI, A.; FISCHER, W.; GUNTHER, A.; FRANKE, H.; GROGER-ARNDT, H.; NORENBERG, W.; MADARASZ, E.; VIZI, E.S.; SCHNEIDER, D.; SPERLAGH, B. Y ILLES, P. (2005) Supersensitivity of P2X receptors in cerebrocortical cell cultures after in vitro ischemia. *J. Neurochem.* 95: 1421-1437.
- (170) CAVALIERE, F.; DINKEL, K. Y REYMANN, K. (2005) Microglia response and P2 receptor participation in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage. *Neuroscience*. 136: 615-623.
- (171) Tran, M.D. y Neary, J.T. (2006) Purinergic signaling induces thrombospondin-1 expression in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 9321-9326.
- (172) Koizumi, S.; Shigemoto-Mogami, Y.; Nasu-Tada, K.; Shinozaki, Y.; Ohsawa, K.; Tsuda, M.; Joshi, B.V.; Jacobson, K.A.; Kohsaka, S. y Inoue, K. (2007) UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*. 446: 1091-1095.
- (173) BIANCO, F.; CERUTI, S.; COLOMBO, A.; FUMAGALLI, M.; FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; MATTEOLI, M.; DI VIRGILIO, F.; ABBRACCHIO, M.P. Y VERDERIO, C. (2006) A role for P2X7 in microglial proliferation. *J. Neurochem.* 99: 745-758.
- (174) Neary, J.T.; Kang, Y.; Shi, Y.F.; Tran, M.D. y Wanner, I.B. (2006) P2 receptor signalling, proliferation of astrocytes, and expression of molecules involved in cell-cell interactions. *Novartis Found. Symp.* 276: 131-143.
- (175) WASHBURN, K.B. Y NEARY, J.T. (2006) P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: Difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation. *Neuroscience*. 142: 411-423.
- (176) Brambilla, R.; Burnstock, G.; Bonazzi, A.; Ceruti, S.; Cattabeni, F. y Abbracchio, M.P. (1999) Cyclo-oxygenase-2 mediates P2Y receptor-induced reactive astrogliosis. *Br. J. Pharmacol.* 126: 563-567.
- (177) ARTHUR, D.B.; GEORGI, S.; AKASSOGLOU, K. Y INSEL, P.A. (2006) Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *J. Neurosci.* 26: 3798-3804.
- (178) Chorna, N.E.; Santiago-Perez, L.I.; Erb, L.; Seye, C.I.; Neary, J.T.; Sun, G.Y.; Weisman, G.A. y Gonzalez, F.A. (2004) P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J. Neurochem.* 91: 119-132.
- (179) Franke, H.; Grummich, B.; Hartig, W.; Grosche, J.; Regenthal, R.; Edwards, R.H.; Illes, P. y Krugel, U. (2006) Changes in purinergic signaling after cerebral injury involvement of glutamatergic mechanisms? *Int. J. Dev. Neurosci.* 24: 123-132.

5. Fisiopatología de la neurotransmisión glicinérgica

CARMEN ARAGÓN RUEDA Y BEATRIZ LÓPEZ-CORCUERA

RESUMEN

El neurotransmisor glicina tiene un papel doble en el sistema nervioso central (SNC), como inhibidor en vías glicinérgicas y como activador del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) en vías glutamatérgicas excitadoras. La señal inhibidora es transmitida a través del receptor ionotrópico de glicina sensible a estricnina (GlyR), que actúa como un canal de Cl⁻ hiperpolarizando la membrana postsináptica. La terminación de la neurotransmisión es llevada a cabo por la captura de la glicina a través de transportadores específicos dependientes de Na⁺ y Cl⁻, GLYT1 y GLYT2, localizados en la membrana plasmática de las terminales nerviosas y astrocitos próximos a la sinapsis. La generación de ratones deficientes en los genes de estos transportadores y el desarrollo de inhibidores específicos ha permitido establecer el papel que desempeñan in vivo. Los fenotipos de estos animales son homólogos a los síntomas de enfermedades humanas caracterizadas por alteraciones en la neurotransmisión glicinérgica. La hiperplexia hereditaria es una enfermedad neurológica producida por mutaciones en los genes de las subunidades α y β del receptor de glicina y proteínas asociadas. Estudios genéticos recientes han identificado mutaciones en el gen del transportador de glicina GLYT2 en pacientes de hiperplexia. La reciente resolución de la estructura tridimensional de un transportador bacteriano homólogo ha permitido avanzar en el conocimiento del mecanismo funcional de estas proteínas. Parece probable, y resulta esperanzador, que los recientes avances permitan desarrollar compuestos que actúen selectivamente sobre GLYT1 v GLYT2 interfiriendo con la neurotransmisión glicinérgica o glutamatérgica y tengan aplicaciones terapeuticas como antipsicóticos, antiepilépticos o analgésicos.

Palabras clave: Glicina. Sinapsis. Receptores. Transportadores. Hiperplexia.

ABSTRACT

Physiopathology of inhibitory glycinergic neurotransmission

Glycine neurotransmitter has a dual role in the central nervous system, as inhibitor in the glycinergic pathways and as a co-agonist at the excitatory NMDA glutamate receptor. Inhibitory signal is transmitted by activation of the strychnine-sensitive glycine receptor that increases the chloride conductance of the postsynaptic membrane. The synaptic glycine concentration is mainly controlled by two Na⁺ and Cl⁻-dependent transporters, GLYT1 and GLYT2 present at the plasma membrane of nerve terminals and glia. Our understanding of the physiological role of these transporters has recently been enlightened thanks to the development of specific inhibitors, and to the generation of mice defective in the corresponding genes. The symptoms observed in glycine transporter deficient mice are similar to those associated with human hereditary diseases that perturb the glycinergic neurotransmission. Hyperekplexia or startle disease is a mammalian neurological syndrome caused by mutations in genes for several postsynaptic proteins involved in glycinergic transmission as the glycine receptor $\alpha 1$ and β subunits, and related proteins. Recently, mutations in the gene encoding the presynaptic glycine transporter GLYT2 have been identified though genetic analysis of human patients of this disorder. In addition, the three-dimensional resolution of the structure of a bacterial homologue has shed light on the mechanisms of glycine transport. It looks hopeful that this knowledge will prove to be useful for the development of selective drugs for GLYT1 and GLYT2 with antipsychotic, antiepileptic or analgesic applications.

Keywords: Glycine. Synapsis. Receptors. Transporters. Hyperekplexia.

INTRODUCCIÓN

La glicina, el aminoácido proteinogenético más pequeño, desempeña numerosas funciones metabólicas importantes especialmente en el SNC de los mamíferos. Representa, junto con el GABA, uno de los dos transmisores inhibi-

Abreviaturas: AMPA, ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; GABA, ácido gamma-aminobutírico; GCS, sistema de ruptura de glicina; GlyR, receptor de glicina; GLYT, transportador de glicina; HMGN3, grupo N3 de alta movilidad; IPSCs, corrientes postsinápticas espontáneas inhibidoras; NMDA, N-metil-D-aspartato; NSS, neurotransmitter sodium symporter; PSD95, densidad postsináptica 95; SLC6, solute carrier 6; SNARE, receptor de proteínas de anclaje del factor soluble sensible a N-etilmaleimida; SNC, sistema nervioso central; TM, transmembrana.

dores de la neurotransmisión rápida. La glicina es especialmente abundante en zonas caudales del SNC, como el tallo cerebral, la zona pontinocerebelosa y la médula espinal. En el tallo cerebral y la médula espinal, las interneuronas glicinérgicas controlan la generación de ritmos motores, la coordinación de respuestas reflejas espinales y el procesamiento de señales sensoriales y nociceptivas. Las interneuronas espinales glicinérgicas del tipo Ia median circuitos reflejos de inhibición recíproca, permitiendo de esta forma la relajación de músculos antagónicos y la contracción coordinada de músculos agonistas, mientras que las interneuronas de Renshaw regulan la excitabilidad de motoneuronas mediante la producción de señales inhibidoras recurrentes a través de un sistema de retroalimentación negativa (1). Por otra parte, la glicina es un importante neurotransmisor implicado en el procesamiento de la información auditiva en los núcleos cocleares, en el complejo de la oliva superior y en el colículo inferior donde interviene en la modulación de diversos circuitos neuronales (2). Un importante aspecto de las acciones de la glicina se refiere al procesamiento de la información visual: hay neuronas glicinérgicas inhibidoras involucradas en la modulación de los campos receptivos en la retina (3). Asimismo, la glicina está implicada en la supresión de las señales nociceptivas en la médula espinal (4). Un segundo papel de la glicina en el SNC, adicional al de neurotransmisor inhibidor, es el de neuromodulador en vías glutamatérgicas excitadoras que utilizan el receptor de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) del que la glicina es un activador necesario tanto para la unión del glutamato como para el reciclado del receptor en la membrana plasmática (5).

En una neurona glicinérgica inhibidora (Figura 1), la despolarización producida por la llegada de un potencial de acción al terminal provoca la liberación de la glicina contenida en vesículas sinápticas mediante exocitosis dependiente de calcio (exocitosis regulada). Tras su liberación en el espacio sináptico, la glicina interacciona y activa receptores postsinápticos específicos (GlyRs) que pertenecen, al igual que los receptores de GABAAC, a la superfamilia de receptores pentaméricos cuyo paradigma es el receptor nicotínico de acetilcolina (6). La activación de GlyR determina la apertura de un canal en la proteína que provoca flujo de cloruro al citoplasma de la neurona postsináptica. La hiperpolarización resultante estabiliza el potencial de membrana alrededor del valor de reposo, alejándolo del de activación y, por lo tanto, inhibe a la neurona postsináptica (7). La acción neurotransmisora de la glicina finaliza cuando su concentración en la sinapsis disminuye y se recuperan los niveles anteriores a la estimulación. Los transportadores específicos (GLYTs) localizados en la membrana plasmática de las neuronas o de las células de glía adyacentes llevan a cabo esta fase final de la neurotransmisión al transportar glicina activamente ha-

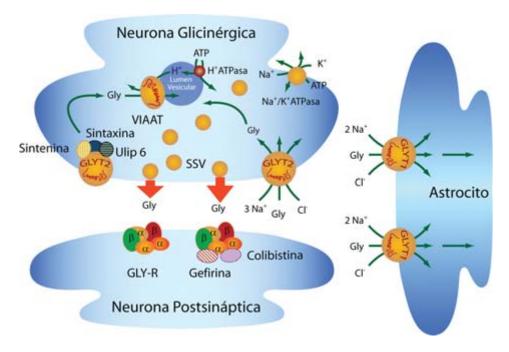


Figura 1. Esquema de la sinapsis glicinérgica inhibidora. Se indican los siguientes elementos presinápticos: el transportador de glicina GLYT2 acoplado a 3Na⁺ y 1Cl⁻ y las proteínas asociadas sintenina, Ulip-6 y sintaxina1A; el transportador de glicina y GABA de vesículas sinápticas, VIAAT, y las bombas iónicas H⁺ATPasa de vesículas sinápticas (SSV) y Na⁺K⁺ATPasa de membrana plasmática. GLYT1 es el transportador glial de glicina. En el elemento postsináptico se indican los receptores pentaméricos de glicina GlyR y las proteínas asociadas gefirina y colibistina.

cia el interior celular. El ciclo iniciado por la despolarización neuronal se completa con el rellenado de las vesículas sinápticas con la glicina presente en el citoplasma de la terminal nerviosa, función que lleva a cabo el transportador vesicular, VIAAT/VGAT (8, 9). La glicina y el GABA comparten el mismo transportador vesicular, lo que permite que algunos terminales inhibidores (mixtos) almacenen conjuntamente ambos neurotransmisores en las mismas vesículas desde donde serán liberados simultáneamente (10).

Los niveles de glicina en las células nerviosas son el resultado de la contribución relativa de la acumulación mediada por los transportadores, de su sín-la tesis *de novo* y de su degradación. El metabolismo de la glicina en el SNC es considerablemente activo e implica dos rutas mitocondriales dependientes de piridoxal-5-fosfato. La síntesis *de novo* se produce gracias a la actividad catalí-

tica de la enzima «serina hidroximetiltransferasa o serina hidroximetilasa» que retira un fragmento hidroximetilo de la serina para generar glicina utilizando como aceptor el tetrahidrofolato. La degradación intracelular de la glicina es llevada a cabo por el llamado «sistema de degradación de glicina o descarboxilasa de glicina», (GCS), complejo multienzimático formado por cuatro actividades enzimáticas presentes en cuatro proteínas diferentes, la proteína P (una descarboxilasa dependiente de piridoxal-5-fosfato), la proteína H (una proteína de transferencia de hidrógeno que contiene lipoamida), la proteína T (una transferasa del grupo aminometilo dependiente de tetrahidrofolato) y la proteína L (una deshidrogenada dependiente de NAD+, que requiere FAD). El complejo está asociado a la membrana interna mitocondrial y, en el SNC, se localiza principalmente en las mitocondrias de los astrocitos. El sustrato de este complejo de degradación es la glicina incorporada al interior celular mediante transporte desde el exterior celular (11).

RECEPTOR DE GLICINA

La unión de la glicina a su receptor tipo GlyR genera corrientes producidas por la entrada de iones cloruro en la neurona postsináptica. Las corrientes sinápticas glicinérgicas median respuestas rápidas inhibidoras que siguen un perfil de tiempo complejo. Típicamente comienzan con una primera fase de respuesta postsináptica rápida debida a la apertura inminente y sincrónica de múltiples canales de cloruro por la unión de la glicina sináptica, seguida de una caída lenta y bifásica que corresponde a la inactivación y cierre asincrónico de los canales individuales y la retirada de glicina del espacio intersináptico a través de los transportadores (12, 13). Diversas evidencias han indicado que, en las sinapsis centrales, la retirada del neurotransmisor libre es muy rápida, más que la activación de los receptores, por lo que la unión de la glicina de nuevo al receptor no contribuye a la inhibición mantenida en una misma ronda de señalización (1).

Se puede decir que el receptor de glicina se encuentra entre los mejor conocidos hasta el momento gracias a numerosos estudios bioquímicos, electrofisiológicos, farmacológicos, inmunológicos, genéticos y de biología molecular (14,15). Una parte importante del éxito en el estudio de este receptor se debe a que su unión a la glicina es impedida por el alcaloide convulsivante estricnina, que se extrae del árbol *Strychnos nux vomica*, originario de la India. La estricnina es el antagonista más clásico del receptor y se une a él con gran afinidad reconociendo un epítopo casi solapante, aunque no coincidente, con el sitio de unión de la glicina. Su disponibilidad constituye una valiosa herramienta experimental, aunque actualmente existen antagonistas derivados del ácido quinolínico de más reciente desarrollo (16).

Los GlyR tienen estructura pentamérica y están compuestos por dos tipos de subunidades, las α , funcionales, y las β , estructurales. La estequiometría establecida es de 3α:2β, aunque hay datos recientes que sugieren que la proporción de subunidades puede ser $2\alpha:3\beta$. Hasta el momento, se han identificado cuatro genes diferentes en vertebrados (denominados Glra 1-4) que codifican las cuatro subunidades α (α 1- α 4) que muestran entre sí una elevada identidad de secuencia (más del 80%). Sin embargo, sólo se ha identificado un gen (Glrb) que codifica la subunidad β, de menor homología con las α (un 50% con α 1). Se han descrito variantes α y β por procesamiento alternativo de sus mRNAs. Los diferentes genes tienen patrones de expresión temporal y regional muy definidos. Unida fuertemente a la subunidad β se encuentra la proteína gefirina cuya función es anclar el receptor al citoesqueleto subcortical a través de su unión a tubulina. La gefirina tiene un papel aglutinador de las moléculas de receptor en la membrana plasmática y se asocia también al receptor de GABA_A (16). Otras proteínas como colibistina, profilina, y RAFT1 también participan en el complejo andamiaje asociado con el GlyR (1). Cada una de las subunidades del GlyR está constituida por una cadena polipeptídica con cuatro dominios transmembrana con los extremos amino y carboxilo situados en la parte extracelular a modo de antenas. Se conocen con detalle los residuos de aminoácido involucrados en la unión a los ligandos glicina y estricnina que están situados en la región que precede al segmento M1 de las subunidades α. También se conocen los aminoácidos implicados en la interacción con subunidades adyacentes y la unión a un gran número de sustancias de interés como β-aminoácidos (taurina, β-alanina), anestésicos, alcoholes, esteroides, Zn²⁺, etc. En el bucle citoplásmico que une los segmentos M3 y M4 hay seis residuos cargados positivamente necesarios para la correcta topología de la subunidad α1. En el dominio M2 de las subunidades α, residen los determinantes moleculares responsables de la estricta especificidad aniónica del canal, (dos residuos de arginina), cuyo tamaño de poro es de 5.2 Å y que, al igual que los receptores GABA_{A/C}, presenta un orden de selectividad I⁻> Br⁻ > Cl⁻ > F⁻ siendo además bastante permeables a CO₃H⁻ (13).

Las sinapsis glicinérgicas son funcionalmente heterogéneas. El mayor determinante de esta variabilidad es la diversidad de subtipos de GlyR generados por diferentes combinaciones de subunidades, aunque esto también depende de

otros factores como morfología de la hendidura sináptica, nivel de agregación de receptores, localización, ... Los estudios in vitro de expresión heteróloga han demostrado que la composición de subunidades del receptor tiene una importante repercusión en propiedades funcionales y farmacológicas como la conductancia del canal, la cinética de activación y la sensibilidad a bloqueantes y moduladores (16). No obstante, el papel fisiológico de los distintos tipos de receptores no ha sido definitivamente establecido y constituye un área de intensa investigación. La subunidad β se expresa abundantemente en el SNC embrionario y postnatal. Los GlyRs que contienen la subunidad α1 son los más abundantes y se expresan ampliamente en médula espinal en estadio embrionario, postnatal y adulto, y además en tallo cerebral, colículos y retina de neonato y adulto. De hecho, la expresión del mRNA de la subunidad α1 solapa con el marcaje de [3H] estricnina, lo que es coherente con un papel primordial en el control de la coordinación de las respuestas reflejas espinales del receptor con protámeros $\alpha 1$ y β . De las subunidades minoritarias $\alpha 3$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$, sólo está presente en médula espinal de adulto la α3, aunque en niveles moderados, así como en cerebelo y bulbo olfativo. La α2 se expresa abundantemente en la médula espinal en el estado embrionario y postnatal, pero no en adulto, en el que hay bajos niveles en hipocampo, corteza cerebral, tálamo y retina. La completa distribución de la α4 permanece elusiva debido a su escasez. Recientemente, se ha descrito que los GlyR con subunidades \alpha3 están implicados selectivamente en la supresión nociceptiva espinal y pueden ser un blanco terapéutico en el tratamiento del dolor. Los GlyRα3 localizados en las dendritas de interneuronas de la sustancia gelatinosa donde las fibras aferentes nociceptivas hacen contacto sináptico, se activan reduciendo la generación de espigas y por tanto la señal nociceptiva. Durante la inflamación esta supresión se relaja por acción de la prostaglandina E que modula negativamente al receptor, generando hipersensibilidad a estímulos mecánicos y térmicos (4, 13). Sin embargo, en la retina de mamíferos donde la distribución de GlyR es muy amplia y la transmisión glicinérgica desempeña un papel crucial en el procesamiento de las señales luminosas (17), las diferencias en la composición de GlyRs se han asociado a un papel fisiológico concreto. Las diferentes subunidades α del receptor se distribuyen selectivamente en los distintos tipos neuronales de la retina (bipolares α1, ganglionares $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, amacrinas $\alpha 2$) y, puesto que presentan distintas velocidades de respuesta, determinan diferencias temporales que condicionan el orden en que las señales visuales llegan a los centros cerebrales superiores, permitiendo su interpretación (18, 19).

Al igual que otros receptores, los GlyRs se localizan preferentemente en las densidades postsinápticas y en menor medida en la membrana extrasináptica.

Aunque la neurotransmisión tiene lugar mayoritariamente en la sinapsis, los receptores localizados en la región extrasináptica pueden activarse por el neurotransmisor liberado de forma no vesicular o por el que accede por difusión procedente de las sinapsis adyacentes. Así, la activación de los GlyRs sinápticos por altas concentraciones de glicina liberada por exocitosis en la sinapsis provocará una inhibición «fásica» y la activación persistente de los receptores por niveles bajos de glicina en la zona extrasináptica provocará una inhibición mantenida «tónica» de los GlyRs. Parece que la inhibición tónica está mediada por GlyRs que difieren en composición molecular y propiedades de respuesta respecto a los sinápticos. Así, muchos moduladores tienen efectos diferenciales en receptores sinápticos o extrasinápticos. La estructura y papel de los GlyRs extrasinápticos en la mediación de procesos de importancia fisiológica, como el desarrollo, es objeto actual de estudio.

TRANSPORTADORES DE GLICINA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Distribución y función

La glicina liberada al espacio sináptico es retirada por transportadores específicos localizados en la membrana plasmática de las neuronas o de las células de glía adyacentes. Transportan glicina con alta afinidad (Km de orden μM) por un mecanismo activo, electrogénico, acoplado al gradiente electroquímico de Na⁺ y dependiente de Cl⁻. La Na⁺-K⁺-ATPasa genera y mantiene el gradiente de Na⁺ a través de la membrana plasmática, lo que proporciona la energía necesaria para el transporte del neurotransmisor desde el espacio sináptico hacia el interior de los terminales nerviosos en contra de un gradiente de concentración de varios órdenes de magnitud. Existen dos variantes de transportadores de alta afinidad en el SNC de mamíferos llamados GLYT1 y GLYT2 producidos por genes diferentes (Slc6a9 y Slc6a5) de los cuales, a su vez, existen varias isoformas generadas mediante procesamiento alternativo de los mensajeros, o por el uso de diferentes promotores (20). GLYT1 y GLYT2 son miembros de la familia de transportadores SLC6 o NSS que incluye a los transportadores de los neurotransmisores noradrenalina, dopamina, serotonina y GABA, así como a transportadores de sustancias no neurotransmisoras (osmolitos o aminoácidos). Se han identificado, además, homólogos «huérfanos» de los que se desconoce el sustrato, y algunos ortólogos bacterianos. Los transportadores de neurotransmisores de esta familia requieren el transporte de Cl

junto al Na⁺ y el neurotransmisor, pero este requerimiento no es extensivo a los miembros procariotas.

GLYT1 y GLYT2 son proteínas homólogas que ostentan alrededor del 50% de identidad de secuencia. Sin embargo, desempeñan papeles complementarios en la neurotransmisión glicinérgica debido a que presentan relevantes diferencias en su función y distribución tanto regional como celular (20-22). GLYT2 reside principalmente en áreas caudales del SNC como la médula espinal, tallo cerebral y cerebelo donde se halla exclusivamente localizado en los axones y terminales de neuronas glicinérgicas. GLYT1 tiene una distribución más rostral y se concentra en los astrocitos que circundan y envuelven tanto las sinapsis glicinérgicas como las glutamatérgicas, encontrándose, además, en tejidos periféricos como el páncreas y el hígado (23-25).

Los estudios de silenciamiento génico han demostrado que GLYT1 y GLYT2 ejercen papeles complementarios en la transmisión inhibidora mediada por glicina. GLYT1 es el principal responsable de la terminación de la señal y del mantenimiento de bajos niveles de glicina en las sinápsis, mientras que GLYT2 aumenta la eficacia de la neurotransmisión manteniendo el suministro de glicina al interior del terminal, lo que permite el rellenado de las vesículas sinápticas por el transportador vesicular que tiene baja afinidad por el neurotransmisor (Km del orden mM, (21, 26, 27)). Aunque la localización mayoritaria de GLYT1 es glial, recientemente se ha detectado su presencia en neuronas glutamatérgicas donde se asocia a receptores de glutamato del tipo NMDA (28, 29). Esta distribución resulta idónea para que, mediante regulación de las concentraciones sinápticas de glicina, GLYT1 neuronal ejerza el control de la glicina que se une al receptor NMDA, en tanto que, GLYT1 glial y, en menor medida GLYT2 en el caso de sinapsis inhibidoras, colaboran en el mantenimiento de niveles extracelulares submicromolares de glicina.

Los papeles fisiológicos diferenciales de las dos isoformas GLYT1 y GLYT2 se basan en propiedades termodinámicas únicas (Figura 2). GLYT1 cataliza el cotransporte de sodio/cloruro/glicina con una estequiometría de 2:1:1, mientras que GLYT2 transporta un ion sodio adicional, mostrando una estequiometría de 3:1:1 (30, 31). De este modo, se asegura el transporte vectorial de glicina hacia el terminal ya que la fuerza motriz para el transporte en contra de gradiente de concentración del sustrato es dos órdenes de magnitud mayor en el caso de GLYT2 que en el de GLYT1. Esta característica conlleva que la isoforma neuronal tenga una severa limitación para llevar a cabo el transporte reverso, mientras que GLYT1 puede responder a las necesidades fisiológicas importando o exportando glicina, dependiendo del entorno químico (32).

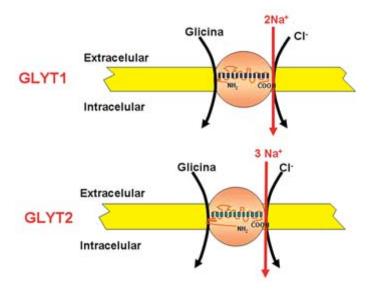


Figura 2. Diferente estequiometría respecto a los iones sodio de los transportadores de glicina. GLYT1 y GLYT2 transportan glicina por un mecanismo de simporte con Na⁺ y Cl⁻. GLYT2 presenta un mayor acoplamiento al gradiente electroquímico de sodio que GLYT1 debido a que cotransporta 3Na⁺ por molécula de glicina y ciclo de translocación, mientras que GLYT1 sólo requiere 2Na⁺.

Relación entre la estructura y la función

Como el resto de transportadores de la familia SLC6/NSS, GLYT1 y GLYT2 son proteínas politópicas con 12 dominios transmembrana (TM) y extremos amino y carboxilo localizados en el interior celular. El segundo bucle extracelular de los GLYTs contiene cuatro residuos de asparragina unidos a cadenas de oligosacárido (33, 34). La estructura tridimensional de estos transportadores ha sido revelada por homología con una proteína homóloga bacteriana, el transportador de leucina de *Aquifex aeolicus* (LeuT_{Aa}), cuya estructura cristalina ha sido establecida a una resolución de 1.65 Å (35). Esta elevada resolución, infrecuente entre las proteínas de membrana, ha proporcionado numerosas claves para desentrañar las bases estructurales del funcionamiento de los transportadores de la familia SLC6/NSS. Aunque el grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de LeuT_{Aa} en relación con sus homólogos de eucariotas es escasa (20-25%), sin embargo aumenta considerablemente en las secuencias de las hélices α TM donde residen los sitios de unión a sustratos e iones. La secuencia de las regiones más hidrofílicas, extremos amino y carboxilo terminales así como los

bucles extra e intracelulares que conectan los segmentos TM, son las de menor nivel de conservación.

El plegamiento de LeuT_{Aa} constituye una estructura novedosa, no conocida hasta la fecha, aunque con posterioridad se han publicado plegamientos estructuralmente homólogos en dos familias de transportadores no relacionados con los SLC6/NSS, lo que sugiere que representa un patrón estructural más general (36, 37). Las primeras diez hélices α TM constituyen el núcleo de la proteína en el que se reconocen dos mitades que contienen dos elementos estructurales repetitivos con topología invertida (TM1-5 y TM6-10) que pueden superponerse por rotación de uno de ellos respecto al plano de la membrana. La interfase entre estas dos repeticiones o mitades contiene el sitio de unión al sustrato y dos iones sodio (Na1 y Na2). El bolsillo de unión está formado por residuos de los TM1 y TM6 que, dispuestos de modo antiparalelo, tienen interrumpida la estructura α-helicoidal en su porción central, así como residuos de los TM3, TM7 y TM8. El grupo carboxilo del sustrato está en contacto directo con el ión sodio en Na1, lo que proporciona una base estructural muy adecuada para explicar el acoplamiento iónico del movimiento del sustrato durante el cotransporte. Dos residuos aromáticos (Tyr108 y Phe253) estabilizan un par iónico entre los residuos Arg30-Asp404, que actúa a modo de compuerta externa y, en el lado citoplasmático, el par Arg5-Asp369 forman la compuerta interna. En la estructura cristalizada, ambas compuertas aparecen cerradas. Algunos de los residuos que forman el bolsillo de unión de LeuTAA se habían identificado en estudios funcionales previos con mutantes de neurotransportadores, lo que demuestra que la estructura es relevante para otros miembros de la familia SLC6/NSS. Tal es el caso de la Tyr108 del TM3, conservada en toda la familia, cuyo grupo hidroxilo interacciona con el carboxilo de la leucina y cuya implicación en la unión del sustrato y actividad de transporte había sido descrita para los transportadores GAT-1, SERT y GLYT2 (38-40). Los determinantes de la especificidad de sustrato parecen residir en las cadenas laterales de los residuos de TM3, TM6 y TM8 que rodean la región no polar de la leucina en LeuT_{Aa}. En GLYT1 y GLYT2 estos residuos son sustituidos por aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas que podrían acomodar mejor a la glicina de menor tamaño (35). El modelo de LeuT_{Aa} ha demostrado su utilidad para los GLYTs ya que ha permitido identificar un residuo del TM6 como único responsable de la diferente sensibilidad de estos transportadores al inhibidor competitivo, sarcosina (N-metilglicina). La presencia de una serina (Ser481) en el sitio de unión al sustrato de GLYT2 impide la interacción de esta isoforma con sarcosina, de mayor tamaño que la glicina. Sin embargo, GLYT1 que en la posición equivalente tiene un residuo de glicina (Gly403), más pequeño, puede no sólo unir la sarcosina sino incluso transportarla (41). Sin embargo, aunque el sitio de unión a glicina puede ser modelado por homología con la estructura bacteriana y los residuos implicados en la coordinación de sodio en los sitios Na1 y Na2 parecen estar conservados entre los transportadores SLC6/NSS, la explicación de estequiometrías alternativas a la 2:1:1 mostradas por algunos componentes de la familia como GLYT2 o SERT, es un aspecto que aun está por resolver (42).

Los transportadores eucariotas SLC6/NSS son funcionalmente dependientes de Cl⁻ para el transporte de sodio y el sustrato, propiedad que está ausente en LeuT_{Aa} y demás miembros bacterianos. La reciente identificación del sitio de cloruro ha confirmado la hipótesis de que el papel funcional del anión es llevado a cabo por aminoácidos con carga negativa (Glu290 en LeuT_{Aa}) en aquellos miembros SLC6 que no lo requieren durante el transporte (43, 44). El sitio propuesto está formado por residuos de TM2, TM6 y TM7 y está a tan sólo 5 Å del sitio Na1, proximidad que justifica el estrecho acoplamiento iónico. El intercambio de glutamato por serina en la posición 290 de LeuT_{Aa} genera mutantes bacterianos dependientes de cloruro y, el cambio recíproco en la posición homóloga en GAT1 y SERT, produce mutantes cuyo transporte es independiente del anión. Se ha sugerido que el papel del cloruro es estabilizar la unión del sodio y compensar las múltiples cargas positivas del complejo de translocación, por lo que es requerido en las etapas iniciales del ciclo de transporte (43, 44).

Mecanismo funcional: modelo de acceso alternante

Está bastante aceptado que los transportadores funcionan exponiendo alternadamente los sitios de unión a los sustratos a un lado y otro de la membrana, lo que permite captarlos en un compartimento, y liberarlos en el opuesto. Para que esto suceda, se requiere que las dos compuertas externa e interna no estén abiertas simultáneamente (Figura 3). El ciclo catalítico del transporte se inicia con la unión en el exterior de iones y sustrato a la conformación «hacia fuera» del transportador que mantiene abierta la compuerta externa. Esta unión provoca simultáneamente el cierre de la compuerta externa y la apertura de la interna, con la adquisición de la conformación «hacia dentro». La coordinación en el funcionamiento de las dos compuertas es clave ya que, si se abriesen simultáneamente, la energía contenida en el gradiente de sodio se perdería. Tras la liberación del sustrato y los iones al interior celular, la compuerta interna se cierra a la vez que la externa se abre completando el ciclo (35). La última etapa, el retorno del transportador vacío, es la más lenta y limitante del proceso glo-

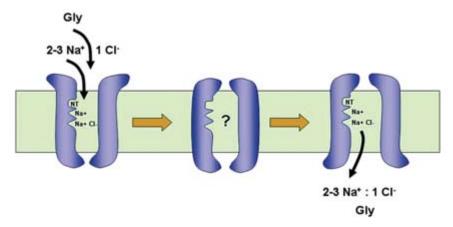


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de «acceso alternante». Las diferentes conformaciones que el transportador adopta a lo largo del ciclo de transporte son tales que los sitios de unión de la glicina y los iones únicamente son accesibles desde un lado de la membrana. Así en el lado externo, el sustrato e iones se unirán a la conformación «hacia fuera» del transportador, esta unión induce cambio/s conformacionales en el transportador, liberándose la glicina e iones desde la conformación «hacia dentro» del transportador por ser los sitios de unión accesibles al interior celular.

bal y las mutaciones que bloquean al transportador en esta etapa, impiden que el ciclo de transporte se complete pero no afectan al intercambio reversible de sustrato e iones a ambos lados de la membrana. Esto explica que el transporte sea más lento que el intercambio, en el que esta etapa de retorno no está implicada. Esta teoría ha encontrado soporte en las estructuras cristalizadas de Leu-T_{Aa} que presentan el bolsillo de unión a los sustratos e iones (incluso inhibidores) aislado del medio acuoso extra e intracelular por las respectivas compuertas (35, 45). Asimismo, el plegamiento de LeuT_{Aa} ha proporcionado una base estructural para la explicación detallada del mecanismo de acceso alternante para el cual han sido propuestos dos modelos. Uno de ellos aprovecha la pseudo-simetría de la estructura de LeuTAa y propone que el transportador sufre un cambio conformacional que abre la compuerta interna a la vez que cierra la externa, de modo que el movimiento de dominios para abrir la compuerta interna es igual y simétrico al que cierra la externa (46). El otro modelo se basa en la demostración de que LeuT_{Aa} presenta un segundo sitio de unión al sustrato que sería el que, tras su unión en la conformación «hacia fuera», determinaría la apertura de la compuerta interna (47). La elucidación del mecanismo por el que se produce el acceso alternante en los transportadores SLC6/NSS aún requiere trabajo experimental.

Oligomerización

Aunque la estructura cristalina de LeuT_{Aa} corresponde a un dímero, la identificación de los elementos estructurales que forman el bolsillo de unión del sustrato e iones en cada monómero sugiere que son funcionales de modo independiente (35). La dimerización de LeuT_{Aa} está sustentada por las dos últimas hélices α (TM11 y TM12) que no intervienen directamente en el núcleo funcional de la proteína. La formación de oligómeros se ha observado en diferentes transportadores eucariotas de la familia SLC6/NSS (ver revision, 48) y, recientemente, se ha demostrado en GLYT1 y GLYT2 en membranas de células transfectadas y de cerebro mediante microscopía FRET y entrecruzamiento de protómeros (49, 50). Sin embargo, aunque es dudoso que la oligomerización de estas proteínas se requiera para el transporte, es probable su implicación en el tráfico del transportador desde su salida del retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática, como se ha descrito para GAT1 y GLYT1 (49,51). Así, cualquier alteración en la capacidad de oligomerización podría impedir el correcto posicionamiento de los transportadores en la membrana y afectar, en definitiva, a la capacidad de transporte.

Consecuencias de la eliminación de los genes codificantes de GLYT1 y GLYT2

La función de GLYT1 y GLYT2 *in vivo* fue puesta de manifiesto mediante la generación de ratones modificados genéticamente a los que se eliminó el gen de GLYT1 (*Slc6a9*) o GLYT2 (*Slc6a5*) (26, 27). Los ratones GLYT1^{-/-} sufrían alteraciones respiratorias y motosensoriales graves caracterizadas por letargia, hipotonía y falta de respuesta a estímulos sensoriales que provocaban su muerte a las 6-14 h tras el nacimiento. Los registros funcionales del circuito neuronal del tallo cerebral responsable del ritmo respiratorio presentaban un patrón irregular y muy lento que se normalizaba con la adición de estricnina, el antagonista del GlyR. Las motoneuronas del núcleo hipogloso del tallo cerebral de estos animales también presentaban una activación tónica elevada de GlyR debido a una concentración de glicina en la sinapsis superior a la normal (26). Estas observaciones revelaron el papel de GLYT1 en el mantenimiento de los niveles de glicina requeridos para una neurotransmisión glicinérgica normal, que impida el fallo respiratorio en el periodo neonatal.

Los ratones GLYT2^{-/-}, aparentemente normales al nacer, sin embargo morían prematuramente durante la segunda semana de vida debido a alteraciones neuromotoras graves caracterizadas por rigidez muscular, espasticidad, temblo-

res, convulsiones. Los análisis electrofisiológicos de neuronas de tallo cerebral aisladas de estos ratones, mostraban una menor amplitud de las corrientes postsinápticas espontáneas inhibidoras glicinérgicas (IPSCs), debido a una disminución de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis. Por tanto, GLYT2 desempeña un papel crucial en el reciclaje de glicina en el terminal presináptico aportando suficiente neurotransmisor para el rellenado de las vesículas sinápticas y el mantenimiento de su contenido (27). Los resultados obtenidos en los ratones deficientes genéticamente permiten adjudicar papeles complementarios, y por tanto no redundantes, a GLYT1 y GLYT2 en la neurotransmisión glicinérgica inhibidora, lo que ha despertado el interés en el desarrollo de una farmacología selectiva de los GLYTs con posibles aplicaciones en la modulación de la neurotransmisión glicinérgica.

Las características funcionales de GLYT1 y GLYT2 son idóneas para llevar a cabo sus respectivos papeles fisiológicos. Debido al mayor acoplamiento a sodio, GLYT2 puede acumular niveles de glicina en el citoplasma de la terminal del orden de mM, coincidiendo con la afinidad del transportador vesicular de glicina, VIAAT. Estudios inmunohistoquímicos han confirmado la mayor acumulación de glicina en neuronas que expresan GLYT2 (52). Además, GLYT2 también participa junto a GLYT1 en la finalización de la acción de la glicina en algunas sinapsis. Prueba de ello es el aumento en los niveles de glicina y prolongación de los potenciales postsinápticos glicinérgicos observados al inhibir GLYT2 con compuestos específicos (53, 54). Por otra parte, GLYT1 puede funcionar de forma reversible retirando o liberando glicina en la sinapsis debido a su menor acoplamiento al gradiente de sodio. Esta liberación de neurotransmisor por un mecanismo independiente de Ca²⁺ puede ser importante en determinadas situaciones fisiopatológicas de despolarización neuronal ó de astrocitos.

El papel que GLYT1 desempeña en la neurotransmisión glutamatérgica no ha podido establecerse en los ratones GLYT1-/- ya que su muerte prematura ocurre con anterioridad al desarrollo de la transmisión mediada por glutamato. Sin embargo, los ratones heterocigotos (GLYT1+/-) adultos, en los que los niveles de GLYT1 caen al 50%, presentan una elevada actividad del receptor de glutamato tipo NMDA respecto a otros tipos (AMPA), y aventajan a los animales controles en pruebas de memoria espacial (55). Estas respuestas son análogas a las que se observan en animales en los que se ha producido inhibición farmacológica de GLYT1 *in vivo* (56). Resultados similares se desprenden de un reciente trabajo con ratones mutantes condicionales en los que el gen de GLYT1 se elimina selectivamente de neuronas del cerebro anterior (57, 58). Así, los datos indican que el bloqueo o baja expresión de GLYT1 puede producir la sobresti-

mulación de los receptores de glutamato tipo NMDA debido a la elevación de los niveles sinápticos de glicina.

Regulación de los transportadores de glicina

En la actualidad son escasos los datos existentes sobre la regulación de la síntesis y degradación de los transportadores de glicina. La expresión de GLYT1 está regulada por factores de transcripción de la familia HMGN3, muy abundantes en células de glía y retina, coincidiendo con la elevada presencia del transportador (59). El complejo Trb-1/CASK, específico de neuronas, regula la transcripción de GLYT1 al unirse directamente a la región 5´ del promotor (60). En cultivos mixtos glía/neurona, la expresión glial de GLYT1 es dependiente de la actividad de las neuronas adyacentes, a través de un mecanismo aún por determinar (61). En los núcleos cocleares dorsales del sistema auditivo la estimulación acústica de la actividad neuronal regula la transcripción del gen de GLYT2 (62).

En una fase posterior a la síntesis de los transportadores en el ribosoma, los cambios en la actividad y/o en el número de moléculas de GLYT1 y GLYT2 en la membrana plasmática podrían afectar en gran medida a la eficacia de la neurotransmisión inhibidora y excitadora en la que desempeñan su papel. En este sentido, se han propuesto diversos mecanismos reguladores. El tráfico intracelular de GLYT1 y GLYT2 hasta su llegada a la superficie celular está modulado por modificaciones postraduccionales e interacciones con diversas proteínas. La profusa N-glicosilación del bucle extracelular 4 es necesaria para la correcta inserción de GLYT1 y GLYT2 en zonas determinadas de la membrana en células polarizadas (33, 34), aspecto fundamental por tratarse de proteínas neuronales. Las interacciones del extremo C-terminal de GLYT1 con componentes del complejo del exocisto y con la proteína PSD95 parecen contribuir a la fidelidad y estabilidad de la inserción en la membrana, respectivamente (29, 63). En las terminales presinápticas, la interacción de GLYT2 con sintenina-1 y la proteína SNARE sintaxina 1A estabilizan y regulan la inserción del transportador en la membrana (64-66). El extremo N-terminal de GLYT2 interacciona con Ulip-6 (Unc-33), miembro de una familia de proteínas implicadas en el crecimiento axonal. Ulip-6 podría activar la endocitosis de GLYT2, lo que disminuiría la presencia del transportador en la membrana (67). Algunos componentes de vías de señalización, como el Ca²⁺ y la proteína kinasa C, también regulan el tráfico intracelular de los GLYTs (68, 69). Los mecanismos por los que actúan no han sido del todo establecidos, si bien podrían indirectamente modular las interacciones con las proteínas descritas, activar la endocitosis dependiente de ubiquitinación o directamente inducir la exocitosis dependiente de Ca²⁺ a través del complejo SNARE (66). No se ha detectado fosforilación directa de GLYT1 y GLYT2 por la proteína kinasa C y permanece la incógnita de si este mecanismo es responsable de la endocitosis mediada por los ésteres de forbol (70).

El reciente establecimiento de la asociación de GLYT2 con microdominios lipídicos ricos en colesterol y esfingolípidos (*membrane rafts*) en neuronas de tallo cerebral ha añadido un mecanismo nuevo de regulación de la actividad de este transportador. La modificación farmacológica de los componentes lipídicos de los *rafts*, reduce tanto su inclusión en *rafts* como su actividad de transporte de glicina, lo que indica que GLYT2 requiere la localización en balsas lipídicas para mantener una función óptima (71). Además, la endocitosis del transportador podría estar relacionada con su asociación a *rafts*, ya que el tratamiento con ésteres de forbol no sólo activa la internalización de GLYT2, como parece ser una característica general de los transportadores SLC6/NSS, sino que desplaza a GLYT2 de los *rafts*. Sin embargo, un mutante refractario a la endocitosis mediada por ésteres de forbol, no experimenta este efecto y permanece asociado a *rafts* (72).

Otros compuestos a añadir a la numerosa lista de moduladores, en este caso de GLYT1, son el ácido araquidónico, la anandamida, los iones Zn²⁺ y los H⁺. Todos ellos también actúan sobre los receptores NMDA, por lo que la modulación conjunta de ambas proteínas supondría una regulación más precisa y eficaz de la actividad glutamatérgica (73-75).

NEUROTRANSMISIÓN GLICINÉRGICA Y PATOLOGÍAS DEL SNC

Los fenotipos de los ratones GLYT1^{-/-} y GLYT2^{-/-} son muy diferentes entre sí y presentan características similares a los síntomas de dos tipos de enfermedades hereditarias humanas que aparecen en la primera etapa postnatal o en la adolescencia. Los animales GLYT1^{-/-} en sus escasas horas de vida postnatal presentan letargia, hipotonía, escasa respuesta a estímulos táctiles y una severa depresión del ritmo respiratorio, síntomas todos ellos que se manifiestan en la encefalopatía glicinérgica o hiperglicinemia no cetónica humana (OMIM 605899). En los pacientes de esta enfermedad en los que se conoce su etiología, ésta se debe a una defectuosa degradación intracelular de la glicina provocada por mutaciones en alguna de las proteínas del «sistema de degradación de glicina o descarboxilasa de glicina», (GCS). La mayoría de los pacientes presentan defectos en las proteínas P o T mitocondriales, que hacen inactivo al GCS, lo que genera elevados niveles de glicina en los fluidos corporales incluido el fluido cefalo-

rraquídeo (76). Sin embargo en algunos de estos pacientes no se han encontrado tales polimorfismos, lo que abre la posibilidad de que otros genes puedan estar implicados, entre ellos GLYT1, cuya actividad de transporte proporciona sustrato a este complejo de degradación en astrocitos (76, 77). Quizá polimorfismos aún no conocidos del gen de GLYT1 estén asociados con esta enfermedad.

Los ratones mutantes GLYT2-/- presentan síntomas antagónicos a los anteriores, más propios de una hipoglicinemia tales como una alterada coordinación motora, rigidez muscular, espasticidad, temblores frecuentes y convulsiones, entre otros. Este fenotipo reproduce en gran medida los síntomas de la hiperplexia humana (27).

Hiperplexia

Durante mucho tiempo se había considerado a la neurotransmisión gabaérgica como la responsable de diferentes alteraciones neuromusculares como epilepsia y la hiperplexia o enfermedad del sobresalto. Sin embargo, estudios farmacológicos y genéticos han puesto de manifiesto que las vías de neurotransmisión glicinérgica inhibidora están directamente relacionadas con la hiperplexia hereditaria (comúnmente denominada a veces «síndrome del bebé entumecido», OMIM 149400). Es un síndrome clínico poco común que se manifiesta muy pronto tras el nacimiento (o incluso en el periodo intrauterino). Se caracteriza por una respuesta exagerada a estímulos somatosensoriales e hipertonía muscular. Los individuos reaccionan con sobresaltos enérgicos y sostenidos manteniendo una apreciable rigidez de tronco y extremidades con aparición de temblores frecuentes, que en ocasiones recuerdan a las respuestas propias de ataques epilépticos tónicos. Aunque con el paso del tiempo algunos de los síntomas iniciales pueden atenuarse, el riesgo de muerte súbita del bebé es alto como consecuencia de fallos cardiorrespiratorios y espasmos laríngeos (78-80).

Hiperplexia postsináptica: mutaciones en el receptor de glicina (GlyR) y proteínas relacionadas

Los análisis de ligamiento genético llevados a cabo en la década de los 90 demostraron que la región distal del cromosoma 5q estaba relacionada con la hiperplexia hereditaria y que mutaciones en el gen *Glra1* que codifica la subunidad α1 del GlyR, localizado en esa región del cromosoma, 5q32, causaban formas autosómicas dominantes o recesivas de hiperplexia según el tipo y posición de la mu-

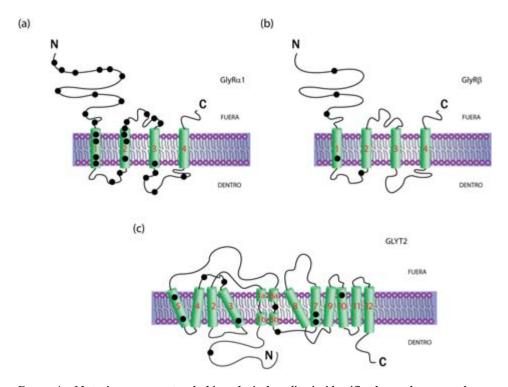


Figura 4. Mutaciones causantes de hiperplexia hereditaria identificadas en los genes de subunidades del receptor de glicina y del transportador de glicina GLYT2. (a) y (b) Estructura secundaria de las subunidades αl y β del receptor postsináptico de glicina GlyR. Son proteínas politópicas que atraviesan la membrana mediante cuatro dominios helicoidales y dejan, a modo de antenas extracelulares, los extremos amino y carboxilo. (c) Estructura secundaria del transportador neuronal de glicina GLYT2. La proteína presenta 12 dominios transmembrana con los extremos amino y carboxilo localizados en el interior celular. Se indica con puntos oscuros la posición en las proteínas de las mutaciones causantes de hiperplexia hereditaria identificadas hasta la fecha en los genes Glra1, Glrb y Slc6a5 que codifican GlyRa1, β y GLYT2, respectivamente.

tación (81, 82). Las alteraciones encontradas en pacientes son sustituciones puntuales de residuos, truncamientos de la proteína (sin sentido) y cambios de fase de lectura. La gran mayoría se deben a polimorfismos que afectan a los dominios M1-M3 del GlyRα1, donde se hallan el sitio de unión a glicina y los determinantes del canal de cloruro. Las mutaciones autosómicas dominantes más numerosas se encuentran próximas al dominio TM2 de GlyRα1, siendo las más frecuentes la sustitución de la Arg271 por Leu o Gln (R271L o R271Q). Este residuo es necesario para la selectividad aniónica del canal de cloruro. Otras mutaciones alteran la comunicación alostérica entre el canal y el sitio glicina determinando una disminución aparente de la afinidad por el neurotransmisor (Figura 4). También se han en-

contrado mutaciones en *Glra1* responsables de formas autosómicas recesivas de la enfermedad, aunque no se han detectado mutaciones en otras subunidades del GlyR (α 2, α 3, α 4), lo que parece coherente con su menor abundancia y su emergente papel en procesos no relacionados con el control de la coordinación de respuestas motoras espinales. Más recientemente se han descrito casos de hiperplexia causados por mutaciones en el gen de la subunidad β del GlyR, *Glrb* (83), así como en los genes de proteínas asociadas al GlyR, como la gefirina (*GPNH*) y colibistina (*ARHGEF9*) que forma parte de la maquinaria de señalización que controla la migración de gefirina hacia la membrana postsináptica en desarrollo (1, 84, 85, para revisión ver 11, 13). Para casi todas estas mutaciones se han generado líneas de ratones mutantes (*Oscillator*, *Nmf11*, *Cincinatti*) que generan fenotipos con sintomatología similar a la manifestada en la enfermedad en humanos (86-88).

Hiperplexia presináptica: mutaciones en el transportador neuronal de glicina GLYT2

Aproximadamente un 70% de los pacientes diagnosticados de hiperplexia hereditaria no presentan mutaciones en los genes GlyR, GPNH o ARHGEF9A, clásicamente asociados con la enfermedad, lo que sugirió la implicación de otros genes en su etiología. Una valiosa pista en la búsqueda de genes candidatos fue proporcionada por los ratones carentes del gen de GLYT2, cuyo fenotipo reproduce los síntomas de los animales con mutaciones en Glra1 (Oscillator, Nmf11, Cincinatti). Los recientes análisis genéticos han permitido describir varias mutaciones en el gen de GLYT2, Slc6a5, localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.1) causantes de hiperplexia humana (89, 90). Slc6a5 posee 16 exones distribuidos en una región de aproximadamente 21.4 Mb en la que sólo el primer exón contiene el sitio de iniciación de la traducción. Se han localizado 11 mutaciones en los pacientes diagnosticados de hiperplexia que están repartidas por el marco de lectura de la proteína y afectan a los exones 2, 5, 7-10 y 13, estando ausentes en individuos sanos. La mayor parte tienen carácter autosómico recesivo. Funcionalmente son mutaciones puntuales o sin sentido que producen, en todos los casos, un transportador inactivo. Algunas generan un transportador truncado y, por lo tanto, inactivo (Y377X, V432F+fs97, O630X, P108L+fs25). Otras, producen una proteína que, si bien se expresa en la membrana plasmática, es una proteína inactiva por fallos en la unión de alguno de sus ligandos, glicina (W482R) o sodio (N509S) o por estar la sustitución en regiones cruciales para la actividad de transporte (T425M, Y491C, N511S). En otros polimorfismos de hiperplexia hereditaria, GLYT2 no se expresa en la membrana plasmática y queda retenido en el retículo

endoplásmico al estar alterado su tráfico intracelular (S512R). Esta mutación es la única que se manifiesta como dominante, lo que ha llevado a sugerir que podría funcionar como dominante negativo del tráfico de GLYT2, probablemente mediante retención del transportador silvestre en un oligómero común. Otros polimorfismos del gen *Slc6a5* producen transportadores aparentemente activos y funcionales, habiéndose propuesto para estos casos fallos en la interacción de GLYT2 con proteínas accesorias necesarias para el correcto tráfico de GLYT2 hacia la membrana en el sistema nervioso (L306V, A89E, G767R, 85,86). Las proteínas sintenina-1, sintaxina 1A y Ulip-6 que interaccionan con GLYT2, así como el transportador vesicular de glicina VIAAT, se consideran posibles candidatos (91). Más recientemente se ha descrito una mutación del gen de GLYT2 vacuno (L270P) como responsable de una enfermedad similar a la hiperplexia humana, la distonía muscular congénita, enfermedad letal para el ganado con las consiguientes repercusiones económicas. La mutación probablemente interrumpe la estructura α helicoidal del TM3, que contiene residuos cruciales en la unión de glicina (35, 92).

Esquizofrenia

El doble papel que GLYT1 desempeña regulando los niveles de glicina en la sinapsis inhibidora glicinérgica y excitadora glutamatérgica convierte al transportador en un blanco terapéutico potencial para algunas patologías asociadas a alteraciones de estas vías nerviosas.

La esquizofrenia es un grave patologia del SNC cuya etiología se ha asociado tradicionalmente a una sobreactivación de vías dopaminérgicas (hipótesis dopaminérgica). El deterioro cognitivo producido en estos pacientes se trata en la actualidad con antipsicóticos, antagonistas de los receptores de dopamina D2. Sin embargo, estudios preclínicos y clínicos realizados en la última década han llevado a desarrollar la hipótesis glutamatérgica que postula que muchos de los síntomas de la patología que afectan al deterioro cognitivo son debidos a una reducida función del receptor NMDA. Así, la inactivación de los genes de algunas subunidades del receptor y la inhibición funcional con agentes específicos que lo bloquean, reproducen algunos de los síntomas psicóticos de la esquizofrenia (93-95). Por otra parte, la sobreexpresión de la subunidad NR2B de NMDA en ratones aumenta su capacidad de aprendizaje, de forma similar a lo observado en ratones mutantes GLYT1+/- (96). Puesto que GLYT1 regula las concentraciones de glicina en el microentorno de los receptores de NMDA y la reducción de la actividad de GLYT1 neuronal mejora el aprendizaje asociativo, en la actualidad parece claro que el bloqueo de transportador GLYT1 constituye un abordaje farmacológico para el tratamiento de la esquizofrenia. En este sentido, son alentadores los resultados de los ensayos clínicos en pacientes de esquizofrenia realizados con sarcosina y derivados que han mostrado mejoría de los síntomas cognitivos y psicóticos (56, 97). Actualmente, varias compañías farmacéuticas están llevando a cabo ensayos preclínicos con una segunda generación de inhibidores de GLYT1 no relacionados estructuralmente con la sarcosina (98, 99). La disponibilidad de inhibidores selectivos de la forma neuronal de GLYT1 permitiría, asimismo, abundar en el estudio de su papel fisiológico.

Otras patologías

La red de interneuronas glicinérgicas localizadas en las astas dorsales de la médula espinal regulan la transmisión de señales nociceptivas desde la periferia a regiones superiores del cerebro (100). El desequilibrio entre la neurotransmisión excitadora e inhibidora de esta región medular desempeña un papel clave en la patología del dolor crónico tanto de tipo inflamatorio como neuropático. Actualmente se considera a la inhibición de la neurotransmisión glicinérgica o desinhibición como el mecanismo responsable de la patología (101). Por tanto el aumento de los niveles de glicina en las sinapsis de las astas dorsales por inhibidores de los GLYTs podría producir analgesia. Los resultados de trabajos recientes demuestran la eficacia de la inhibición de los GLYTs en el control del dolor neuropático en ratones (102, 103).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Investigación e Innovación (BFU2005-05931), el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) del ISCIII, la Comunidad Autónoma de Madrid (\$2006/\$AL-0253), y una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Legendre, P. (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell. Mol. Life.* 58: 760-793.
- (2) Wenthold, R. Y Hunter, C. (1990) Immunochemistry of glycine and glycine receptors in the central auditory system. En: Glycine neurotransmission. (Ottersen OP, Storm-Mathisen J eds), pp.: 391-415. John Wiley, Chichester.

Fisiopatología de la neurotransmisión glicinérgica

- (3) POURCHO, R.G. Y GOEBEL, D.J. (1990) Autoradiographic and immunocytochemical studies of glycine containing neurons in the retina. En: Glycine neurotransmission. (Ottersen OP, Storm-Mathisen J eds), pp.: 355-389. John Wiley, Chichester.
- (4) Harvey, R.J.; Depner, U.B.; Wässle, H.; Ahmadi, S.; Heindl, C.; Reinold, H.; Smart, T.G.; Harvey, K.; Schütz, B.; Abo-Salem, O.M.; Zimmer, A.; Poisbeau, P.; Welzl, H.; Wolfer, D.P.; Betz, H.; Zeilhofer, H.U. y Müller, U. (2004) GlyR alpha 3: an essential target for spinal PGE(2)-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*. 304: 884-887.
- (5) Nonog, Y.; Huang, Y.Q.; Ju, W.; Kalia, L.V.; Ahmadian, G.; Wang, Y.T. and Salter, M.W. (2003) Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature*. 422: 302-7.
- (6) ZAFRA, F.; ARAGÓN, C. Y GIMÉNEZ, C. (1997) Molecular biology of glycinergic neurotransmission. *Mol. Neurobiol.* 14:117-142.
- (7) Betz, H. Y Laube, B. (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem.* 97: 1600-1610.
- (8) McIntre, S. L.; Reimer, R. J.; Schuske, K.; Edwards, R. H. y Jorgensen, E. M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*. 389: 870-876.
- (9) SAGNE, C.; EL MESTIKAWY, S.; ISAMBERT, M. F.; HAMON, M.; HENRY, J. P.; GIROS, B. Y GASNIER, B. (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Lett.* 417: 177-183.
- (10) Gasnier, B. (2004) The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers*. *Arch.* 447: 756-759.
- (11) SAKATA, Y.; OWADA, Y.; SATO, K.; KOJIMA, K.; HISANAGA, K.; SHINKA, T.; SUZUKI, Y.; AOKI, Y.; SATOH, J.; KONDO, H.; MATSUBARA, Y. Y KURE, S. (2001) Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*. 94: 119-130.
- (12) EULENBURG, V.; ARMSEN, W.; BETZ, H. Y GOMEZA, J. (2005) Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem. Sci.* 30: 325-333.
- (13) Betz, H. Y Laube, B. (2006) Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem.* 97: 1600-1610.
- (14) RAJENDRA, S.; LYNCH, J.W. Y SCHOFIELD, P.R. (1997) The glycine receptor. *Pharmacol. Ther.* 73: 121-146.
- (15) Lynch, J.W. (2004) Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physol. Rev.* 84: 1051-1095.
- (16) LAUBE, B.; MAKSAY, G.; SCHEMM, R. Y BETZ, H. (2002) Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 519-527.

- (17) Wassle, H. (2004) Parallel processing in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 747-757.
- (18) Jusuf, P.R.; Haverkamp, S. y Grünert, U. (2005) Localization of glycine receptor alpha subunits on bipolar and amacrine cells in primate retina. *J. Com. Neurol.* 488: 113-128.
- (19) IVANOVA, E.; MÜLLER, U. Y WÄSSLE, H. (2006) Characterization of the glycinergic input to bipolar cells of the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* 23: 350-364.
- (20) LÓPEZ-CORCUERA, B.; GEERLINGS, A. Y ARAGÓN, C. (2001) Glycine neurotransmitter transporters: an update. *Molecular Membrane Biology*. 18: 13-20
- (21) Aragón, C. y López-Corcuera, B. (2005) Glycine transporters: crucial roles of pharmacological interest revealed by gene deletion. *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 283-286.
- (22) ARAGÓN, C. Y LÓPEZ-CORCUERA, B. (2003) Structure, function and regulation of glycine transporters. *Eur. J. Pharmacol.* 479: 249-262.
- (23) JURSKY, F. Y NELSON, N. (1995) Localization of glycine transporter (GLYT2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor. *J. Neurochem.* 67: 336-344.
- (24) Zafra, F.; Aragón, C.; Olivares, L.; Danbolt, N.C.; Giménez, C. y Storm-Mathisen, J. (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15: 3952-3969.
- (25) ZAFRA, F.; GOMEZA, J.; OLLIVARES, L.; ARAGÓN, C. Y GIMÉNEZ, C. (1995) Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1342-1352.
- (26) Gomeza, J.; Hulsmann, S.; Ohno, K.; Eulenburg, V.; Szoke, D.; Richter, D.W. y Betz, H. (2003) Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron*. 40: 785-796.
- (27) Gomeza, J.; Ohno, K.; Hulsmann, S.; Armsen, W.; Eulenburg, V.; Richter, D.W. Y Betz, H. (2003) Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron*. 40: 796-806.
- (28) Cubelos, B.; Giménez, C. y Zafra, F. (2005) Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cer. Cortex.* 15: 448-459.
- (29) Cubelos, B.; González-González, M.I.; Giménez, C. y Zafra, F. (2005) The scaffolding protein PSD-95 interacts with the glycine transporter GLYT1 and impairs its internalization. *J. Neurochem.* 95: 1047-1058.
- (30) LÓPEZ-CORCUERA, B.; MARTÍNEZ-MAZA, R.; NÚÑEZ, E.; ROUX, M.; SUPPLISSON, S.; ARAGÓN, C. (1998) Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters. *J. Neurochem.* 71: 2211-9.
- (31) ROUX, M.J. Y SUPPLISSON, S. (2000) Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron*. 25: 373-383.

- (32) SUPPLISSON, S. Y ROUX, M.J. (2002) Why glycine transporters have different stoichiometries. *FEBS Lett.* 529: 93-101.
- (33) OLIVARES, L.; ARAGÓN, C.; GIMÉNEZ, C. Y ZAFRA, F. (1995) The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter. *J. Biol. Chem.* 270: 9437-9442.
- (34) Martinez-Maza, R.; Poyatos, I.; López-Corcuera, B.; Gimenez, C.; Zafra, F. y Aragon, C. (2001) The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J. Biol. Chem.* 276: 2168-2173.
- (35) Yamashita, A.; Singh, S. K.; Kawate, T.; Jin, Y. y Gouaux, E. (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na+/Cl—dependent neurotransmitter transporters. *Nature*. 437: 215-223.
- (36) FAHAM, S.; WATANBE, A.; BESSERER, G.M.; CASCIO, D.; SPECHT, A.; HIRAYAMA, B.A.; WRIGHT, E.M. Y ABRAMSON, J. (2008) The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na+/sugar symport. *Science*. 32: 810-4.
- (37) WEYAND, S.; SHIMAMURA, T.; YAJIMA, S.; SUZUKI, S.; MIRZA, O.; KRUSONG, K.; CARPENTER, E.P.; RUTHERFORD, N.G.; HADDEN, J.M.; O'REILLY, J.; MA, P.; SSAIDIJAM, M.; PATCHING, S.G.; HOPE, R.J.; NORBERTCZAK, H.T.; ROACH, P.C.; IWATA, S.; HENDERSON, P.J. Y CAMERON, A.D. (2008) Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science*. 322: 709-13.
- (38) BISMUTH, Y.; KAVANAUGH, M.P. Y KANNER, B.I. (1997) Tyrosine 140 of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 plays a critical role in neurotransmitter recognition. *J. Biol. Chem.* 272: 16096-16102.
- (39) Chen, J.G.; Sachpatzidis, A. y Rudnick, G. (1997) The third transmembrane domain of the serotonin transporter contains residues associated with substrate and cocaine binding. *J. Biol. Chem.* 272: 28321-28327
- (40) Ponce, J.; Biton, B.; Benavides, J.; Avenet, P. y Aragon, C. (2000) Transmembrane domain III plays an important role in ion binding and permeation in the glycine transporter GLYT2. *J. Biol. Chem.* 275: 13856-13862.
- (41) VANDENBERG, R. J.; SHADDICK, K. Y JU, P. (2007) Molecular basis for substrate discrimination by glycine transporters. *J. Biol. Chem.* 282: 14447-14453.
- (42) Kanner, B.I. y Zomot, E. (2008) Sodium-coupled neurotransmitter transporters. *Chem. Rev.* 108: 1654-1668.
- (43) Zomot, E.; Bendahan, A.; Quick, M.; Zhao, Y.; Javitch, J.A. y Kanner, B.I. (2007) Mechanism of chloride interaction with neurotransmitter:sodium symporters. *Nature*. 449: 726-730.

- (44) FORREST, L.R.; TAVOULARI, S.; ZHANG, Y.W.; RUDNICK, G. Y HONIG, B. (2007) Identification of a chloride ion binding site in Na+/Cl -dependent transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104: 12761-12766.
- (45) SINGH, S.K.; YAMASHITA, A. Y GOUAUX, E. (2007) Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature*. 448: 952-6.
- (46) Forrest, L.R.; Zhang, Y.W.; Jacobs, M.T.; Gesmonde, J.; Xie, E.L.; Honig, B.H. y Rudnick, G. (2008) Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105: 10338-43.
- (47) Shi, L.; Quick, M.; Zhao, Y.; Weinstein, H. y Javithe, J.A. (2008) The mechanism of a neurotransmitter: sodium symporter—inward release of Na+ and substrate is triggered by substrate in a second binding site. *Mol. Cell.* 30: 667-77.
- (48) FARHAN, H.; FREISSMUTH, M. Y SITTE, H.H. (2006) Oligomerization of neurotransmitter transporters: a ticket from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *Handb. Exp. Pharmacol.* 175: 233-249.
- (49) FERNANDEZ-SANCHEZ, E.; DIEZ-GUERRA, F. J.; CUBELOS, B.; GIMENEZ, C. Y ZAFRA, F. (2008) Mechanisms of endoplasmic-reticulum export of glycine transporter-1 (GLYT1). *Biochem. J.* 409: 669-681.
- (50) BARTHOLOMAUS, I.; MILAN-LOBO, L.; NICKE, A.; DUTERTRE, S.; HASTRUP, H.; JHA, A.; GETHER, U.; SITTE, H.H.; BETZ, H. Y EULENBURG, V. (2008) Glycine transporter dimers: evidence for occurrence in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 283: 10978-10991.
- (51) FARHAN, H.; REITERER, V.; KORKHOV, V. M.; SCHMID, J. A.; FREISSMUTH, M. Y SITTE, H.H. (2007) Concentrative export from the endoplasmic reticulum of the gamma-aminobutyric acid transporter 1 requires binding to SEC24D. *J. Biol. Chem.* 282: 7679-7689.
- (52) POYATOS, I.; PONCE, J.; ARAGON, C.; GIMENEZ, C. Y ZAFRA, F. (1997) The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 49: 63-70.
- (53) Bradaia, A.; Schlichter, R. y Trouslard, J. (2004) Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord. *J. Physiol.* 559: 169-186.
- (54) WHITEHEAD, K.J.; PEARCE, S.M.; WALKER, G.; SUNDARAM, H.; HILL, D. Y BOWERY, N.G. (2004) Positive N-methyl-D-aspartate receptor modulation by selective glycine transporter-1 inhibition in the rat dorsal spinal cord in vivo. *Neuroscience*. 126: 381-390.
- (55) Tsai, G.; Ralph-Williams, R.J.; Martina, M.; Bergeron, R.; Berger-Sweeney, J.; Dunham, K.S.; Jiang, Z.; Caine, S.B. y Coyle, J.T. (2004) Gene knockout of glyci-

- ne transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 8485-8490.
- (56) Kinney, G.G.; Sur, C.; Burno, M.; Mallorga, P.J.; Williams, J.B.; Figueroa, D.J.; Wittmann, M.; Lemaire, W. y Conn, P.J. (2003) The glycine transporter type 1 inhibitor N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarcosine potentiates NMDA receptor-mediated responses in vivo and produces an antipsychotic profile in rodent behavior. *J. Neurosci.* 23: 7586-7591.
- (57) YEE, B.K.; BALILC, E.; SINGER, P.; SCHWERDEL, C.; GRAMPP, T.; GABERNET, L.; KNUESEL, I.; BENKE, D.; FELDON, J.; MOHLER, H. Y BOISON, D. (2006) Disruption of glycine transporter 1 restricted to forebrain neurons is associated with a procognitive and antipsychotic phenotypic profile. *J. Neurosci.* 26: 3169-3181.
- (58) SINGER, P.; BOISON, D.; MOHLER, H.; FELDON, J. Y YEE, B.K. (2007) Enhanced recognition memory following glycine transporter 1 deletion in forebrain neurons. *Behav. Neurosci.* 121: 815-825.
- (59) West, K. L.; Castellini, M.A.; Duncan, M.K. y Bustin, M. (2004) Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Mol. Cell. Biol.* 24: 3747-3756.
- (60) Wang, T.F.; Ding, C.N.; Wang, G.S.; Luo, S.C.; Lin, Y.L.; Ruan, Y.; Hevner, R.; Rubenstein, J.L. y Hsueh, Y.P. (2004) Identification of Tbr-1/CASK complex target genes in neurons. *J. Neurochem.* 91: 1483-1492.
- (61) ZAFRA, F.; POYATOS, I. Y GIMENEZ, C. (1997) Neuronal dependency of the glycine transporter GLYT1 expression in glial cells. *Glia*. 20: 155-162.
- (62) BARMACK, N.H.; Guo, H.; Kim, H.J.; Qian, H. y Qian, Z. (1999) Neuronally modulated transcription of a glycine transporter in rat dorsal cochlear nucleus and nucleus of the medial trapezoid body. *J. Comp. Neurol.* 415: 175-188.
- (63) Cubelos, B.; Gimenez, C. y Zafra, F. (2005) The glycine transporter GLYT1 interacts with Sec3, a component of the exocyst complex. *Neuropharmacology*. 49: 935-944.
- (64) Ohno, K.; Koroll, M.; El Far, O.; Scholze, P.; Gomeza, J. y Betz, H. (2004) The neuronal glycine transporter 2 interacts with the PDZ domain protein syntenin-1. *Mol. Cell. Neurosci.* 26: 518-529.
- (65) GEERLINGS, A.; LOPEZ-CORCUERA, B. Y ARAGON, C. (2000) Characterization of the interactions between the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 and the SNA-RE protein syntaxin 1A. *FEBS Lett.* 470: 51-54.
- (66) GEERLINGS, A.; NUNEZ, E.; LOPEZ-CORCUERA, B. Y ARAGON, C. (2001) Calcium- and syntaxin 1-mediated trafficking of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J. Biol. Chem.* 276: 17584-17590.

- (67) Horiuchi, M.; Loebrich, S.; Brandstaetter, J.H.; Kneussel, M. y Betz, H. (2005) Cellular localization and subcellular distribution of Unc-33-like protein 6, a brain-specific protein of the collapsin response mediator protein family that interacts with the neuronal glycine transporter 2. *J. Neurochem.* 94: 307-315.
- (68) GOMEZA, J.; ZAFRA, F.; OLIVARES, L.; GIMÉNEZ, C. Y ARAGÓN, C. (1995) Regulation by phorbol esters of the glycine transporter (GLYT1) in glioblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1233: 41-46.
- (69) Fornés, A.; Nunez, E.; AragonN, C. y Lopez-Corcuera, B. (2004) The second intracellular loop of the glycine transporter 2 contains crucial residues for glycine transport and phorbol ester-induced regulation. *J. Biol. Chem.* 279: 22934-22943.
- (70) SATO, K.; ADAMS, R.; BETZ, H. Y SCHLOSS, P. (1995) Modulation of a recombinant glycine transporter (GLYT1b) by activation of protein kinase C. *J. Neurochem.* 65: 967-73.
- (71) Núñez, E.; Alonso-Torres, P.; Fornés, A.; Aragón, C. y López-Corcuera, B. (2008) The neuronal glycine transporter GLYT2 associates with membrane rafts: functional modulation by lipid environment. *J. Neurochem.* 105: 2080-2090.
- (72) Fornés, A.; Nunez, E.; Alonso-Torres, P.; Aragon, C. y López-Corcuera, B. (2008) Trafficking properties and activity regulation of the neuronal glycine transporter GLYT2 by protein kinase C. *Biochem. J.* 412: 495-506.
- (73) PEARLMAN, R.J.; AUBREY, K.R. Y VANDENBERG, R.J. (2003) Arachidonic acid and anandamide have opposite modulatory actions at the glycine transporter, GLYT1a. *J. Neurochem.* 84: 592-601.
- (74) Ju, P.; Aubrey, K.R. y Vandenberg, R.J. (2004) Zn²⁺ inhibits glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *J. Biol. Chem.* 279: 22983-22991.
- (75) Aubrey, K.R.; Mitrovic, A.D. y Vandenberg, R.J. (2000) Molecular basis for proton regulation of glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *Mol. Pharmacol.* 58: 129-135.
- (76) APPLEGARTH, D.A. Y TOONE, J.R. (2001) Nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy): laboratory diagnosis. *Mol Genet Metab*. 74: 139-46.
- (77) Vergouwe, M.N.; Tijssen, M.A.; Shiang, R.; Van Dijk, J.G.; Al Shahwan, S.; Ophoff, R.A. y Frants, R.R. (1997) Hyperekplexia-like syndromes without mutations in the GLRA1 gene. *Clin Neurol Neurosurg*. 99: 172-178.
- (78) SUHREN, O.; BRUYN, G. Y TYNMAN, J. (1966) Hyperekplexia. A hereditary startle syndrome. *J. Neurol. Sci.* 3: 577-605.
- (79) SAENZ-LOPE, E.; HERRANZ-TANARRO, F.J.; MASDEUU, J.C. Y CHACÓN-PEÑA, J.R. (1984) Hyperekplexia: a syndrome of pathological startle responses. *Ann neurol*. 15: 36-41.

- (80) Praveen, V.; Patote, S.K. y Whitehall, J.S. (2001) Hyperekplexia in neonates. *Postgrad. Med. J.* 77: 570-572.
- (81) Shiang, R.; Ryan, S.G.; Zhuy, Z.; Hahan, A.F.; O'Connell, P. y Wasmuth, J.J. (1993) Mutations in the α1 subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nature Gen.* 5: 351-358.
- (82) Rees, M.I.; Aandrew, M.; Jawad, S. Y Owen, M.J. (1994) Evidence for recessive as well as dominant forms of startle disease (hyperekplexia) caused by mutations in the α1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *Hum. Mol. Genet.* 3: 2175-2179.
- (83) REES, M.I.; LEWIS, T.M.; KWOK, J.B.; PORTIER, G.R.; GOVAERT, P.; SNELL, R.G.; SCHOFIELD, P.R. Y OWEN, M.J. (2002) Hyperekplexia associated with compound heterozygote mutations in the beta-subunit of the human inhibitory glycine receptor (*GLRB*). *Hum. Mol Genet.* 11: 853-860.
- (84) REES, M.I.; WALDVOGEL, H.J.; WARD, H.; WHITE, J.H.; EVANS, L.; DUGUID, I.C. Y COL. (2003) Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (*GPHN*), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *J. Biol. Chem.* 278: 24688-24699.
- (85) Harvey, K.; Duguid, I.C.; Alldred, M.J.; Beatty, S.E.; Ward, H.; Keep, N. H. y col. (2004) The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J. Neurosci.* 24: 5816-5826.
- (86) MULHARDT, C.; FISCHER, M.; GASS, P.; SIMON-CHAZOTTES, D.; GUENET, J. L.; KUHSE, J.; BETZ, H. Y BECKER, C.M. (1994) The spastic mouse: aberrant splicing of glycine receptor beta subunit mRNA caused by intronic insertion of L1 element. *Neuron.* 13: 1003-1015.
- (87) SAUL, B.; SCHMIEDEN, V.; KLING, G.; MULHARDT, C.; GASS, P.; KHUSE, J. Y BEKER, C.M. (1994) Point mutation of glycine receptor alpha 1 subunit in the spasmodic mouse affects agonist responses. *FEBS Lett.* 350: 71-76.
- (88) Buckwalter, M.S.; Соок, S.A.; Davisson, M.T.; White, W.F. y Самрег, S.A. (1994) A frameshift mutation in the mouse alpha 1 glycine receptor gene (Glra1) results in progressive neurological symptoms and juvenile death. *Hum. Mol. Genet.* 3: 2025-2030.
- (89) REES, M.I.; HARVEY, K.; PEARCE, B.R.; CHUNG, S.K.; DUGUID, I.C.; THOMAS, P. Y COL. (2006) Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nature Genet*. 38: 801-806.
- (90) EULENBURG, V.; BECKER, K.; GOMEZA, J.; SCHMITT, B.; BECKER, C.M. Y BETZ, H. (2006) Mutations within the human GLYT2 (SLC6A5) gene associated with hyperekplexia. *Biochem. Biophy.s Res. Comm.* 348: 400-405.

- (91) HARVEY, R.J.; CARTA, E.; PEARCE, B.R.; CHUNG, S.K.; SUPPLISSON, S.; REES, M.I. Y HARVEY, K. (2008) A critical role for glycine transporters in hyperexcitability disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 1: 1.
- (92) Charlier, C.; Coppieters, W.; Rollin, F.; Desmecht, D.; Agerholm, J.S.; Cambisano, N.; Carta, E.; Dardano, S.; Dive, M.; Fasquelle, C.; y col. (2008) Highly effective SNP-based association mapping and management of recessive defects in livestock. *Nat. Genet.* 40: 449-454.
- (93) Coyle, J.T. (2006) Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26: 365-384.
- (94) JAVITT, D.C. (2004) Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry*. 9: 984-997.
- (95) Mohn, A.R.; Gainetdinov, R.R.; Caron, M.G. y Koller, B.H. (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell.* 98: 427-36.
- (96) TANG, Y.P.; WANG, H.; FENG, R.; KYIN, M. Y TSIEN, J.Z. (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*. 41: 779-790.
- (97) Tsai, G.; Lane, H.Y.; Yang, P.; Chong, M.Y. y Lange, N. (2004) Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 55: 452-456.
- (98) Sur, C. Y Kinney, G.G. (2007) Glycine transporter 1 inhibitors and modulation of NMDA receptor-mediated excitatory neurotransmission. *Curr. Drug Targets*. 8: 643-649.
- (99) JAVITT, D.C. (2008) Glycine transport inhibitors and the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 63: 6-8.
- (100) MELZACK, R. Y WALL, P.D. (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 150: 971-979.
- (101) Zeilhofer, H.U. (2008) Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain—contributions of inflammation and microglia. *Int. Immunopharmacol.* 8: 182-187.
- (102) Tanabe, M.; Takasu, K.; Yamaguchi, S.; Kodama, D. y Ono, H. (2008) Glycine transporter inhibitors as a potential therapeutic strategy for chronic pain with memory impairment. *Anesthesiology*. 108: 929-937.
- (103) MORITA, K.; MOTOYAMA, N.; KITAYAMA, T.; MORIOKA, N.; KIFUNE, K. Y DOHI, T. (2008) Spinal antiallodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326: 633-645.

6. Endocannabinoides: un nuevo sistema de comunicación en el cerebro

MANUEL GUZMÁN E ISMAEL GALVE-ROPERH

RESUMEN

La marihuana (*Cannabis sativa* L.) se ha empleado tanto médica como recreativamente desde hace muchos siglos. Sin embargo, la estructura química de sus componentes activos (los cannabinoides) no se dilucidó hasta los años 1960. Hoy en día sabemos que los cannabinoides actúan en el organismo a través de receptores específicos que son normalmente activados por una familia de moléculas endógenas denominadas endocannabinoides. Este sistema endocannabinoide regula críticamente la neurotransmisión en numerosas regiones del sistema nervioso central, actuando como una señal retroinhibidora para evitar el exceso de actividad presináptica. Estos y otros hallazgos han contribuido a una extraordinaria expansión en el conocimiento básico de cómo los (endo)cannabinoides actúan en nuestro organismo, así como al renacimiento del estudio tanto de sus propiedades terapéuticas como de sus acciones como sustancias de abuso.

Palabras clave: Cannabinoide. Receptor. Neuromodulación. Neurona. Glía.

ABSTRACT

Endocannabinoids: a new brain communication system

Marijuana (*Cannabis sativa* L.) has been used both medicinally and recreationally for many centuries. However, the chemical structure of its active ingredients (the cannabinoids) was not elucidated until the 1960s. Nowadays we

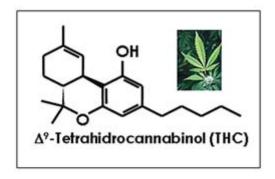
know that cannabinoids act in the body via specific receptors that are normally engaged by a family of endogenous molecules termed endocannabinoids. This endocannabinoid system is a key regulator of neurotransmission in many areas of the central nervous system, acting as a feedback signal that prevents excessive presynaptic activity. These and other findings have contributed to a great expansion in the basic knowledge of how (endo)cannabinoids act in our body, as well as to the renaissance of the study of both their therapeutic properties and their drug-of-abuse actions.

Keywords: Cannabinoid. Receptor. Neuromodulation. Neuron. Glia.

CANNABINOIDES

La marihuana (*Cannabis sativa* L.) es la única especie del reino vegetal que de manera bien establecida produce cannabinoides, una familia de moléculas bioactivas de la cual se conocen hoy en día más de setenta representantes diferentes (1). Aunque no se han estudiado con detalle las propiedades farmacológicas de la mayoría de estos compuestos, está ampliamente aceptado que el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC; Figura 1) es el más importante tanto por su alta abundancia en la planta como por su elevada potencia de acción (1, 2). Otros cannabinoides como el cannabinol y el cannabidiol pueden aparecer así mismo en niveles significativos en la planta y sus preparados, pero su potencia de acción es muy reducida. Desde los años 1990 sabemos que el THC ejerce su gran variedad de efectos, tanto en el sistema nervioso central como en distintas localizaciones periféricas del organismo, debido a que es similar a una familia de moléculas producida por numerosos animales, incluido el ser humano, y cuya

Abreviaturas: AC, adenilil ciclasa; AEA, *N*-araquidonoiletanolamina (anandamida); 2-AG, 2-araquidonoilglicerol; ATF-4, factor activador de la transcripción 4 (activating transcription factor 4); cAMP, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico; CHOP, proteína homóloga a *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP) (*C/EBP homologue protein*); DAG, *sn*-1,2-diacilglicerol; DAGL, *sn*-1-diacilglicerol lipasa; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares (extracellular signal-regulated kinase); FAAH, amidohidrolasa de ácidos grasos (fatty acid amide hydrolase); GABA, ácido γ-aminobutírico; iR, receptor ionotrópico; JNK, quinasa del extremo *N*-terminal de c-Jun (*c-Jun N-terminal kinase*); MAGL, monoacilglicerol lipasa; mR, receptor metabotrópico; NAPE, *N*-acilfosfatidiletanolamina; NMDA, *N*-metil-D-aspartato, NT, neurotransmisor; PKA, proteína quinasa A; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; RIM-1α, molécula que interacciona con Rab3 1α (*Rab3-interacting molecule-1·*); SM, esfingomielina; SMasa, esfingomielinasa; SPT, serina palmitoiltransferasa; THC, Δ⁹-tetrahidrocannabinol; TRB3, homólogo de la proteína *tribbles* 3 (*tribbles homologue* 3); VSCC, canal de Ca²⁺ sensible a potencial (*voltage-sensitive Ca²⁺ channel*).



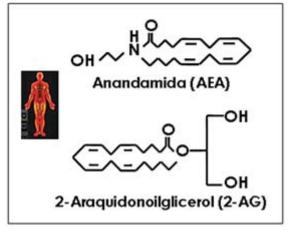


FIGURA 1. **Estructura química de los principales cannabinoides**. Estructura química del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (principal fitocannabinoide) y la anandamida y el 2-araquidonoilglicerol (principales endocannabinoides).

acción por tanto mimetiza. Estas moléculas se denominan por ello cannabinoides endógenos o endocannabinoides. Químicamente hablando se trata de derivados del ácido araquidónico, y la anandamida (*N*-araquidonoiletanolamina, AEA) (3) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (4,5) son sus principales representantes (Figura 1). Se han obtenido además en el laboratorio muy diversos análogos sintéticos de los cannabinoides naturales, tanto de la planta (fitocannabinoides) como de los endocannabinoides, que muestran una especificidad y potencia de acción mucho más elevadas, y entre cuyos representantes el WIN-55,212-2 y el HU-210 son quizás los actualmente más empleados como herramientas farmacológicas en la investigación sobre cannabinoides.

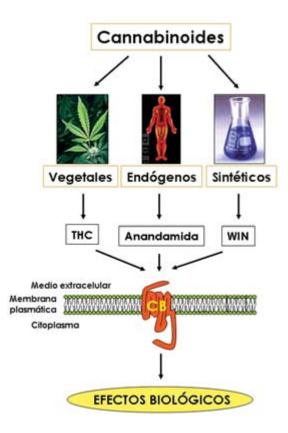


FIGURA 2. Cannabinoides y sus receptores. Los tres tipos de cannabinoides (vegetales, endógenos y sintéticos, cuyos ejemplos más representativos podrían ser THC, anandamida y WIN-55,212-2, respectivamente) se unen a los mismos receptores (receptores CB) en la superficie celular, y a través de ellos median sus efectos biológicos.

RECEPTORES DE CANNABINOIDES

Al ser compuestos estrechamente relacionados entre sí, los cannabinoides tanto endógenos como de *C. sativa* y sintéticos actúan en el organismo mediante las mismas dianas moleculares. Se trata de receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células que se denominan receptores de cannabinoides o receptores CB (Figura 2) y de los cuales existen hoy en día dos tipos bien caracterizados molecular y farmacológicamente: el receptor de tipo 1 ó receptor CB₁ (6) y el receptor de tipo 2 ó receptor CB₂ (7). Es posible no obstante que existan en el organismo otros receptores, como GPR55 (8) o TRPV1 (9), que medien algunas ac-

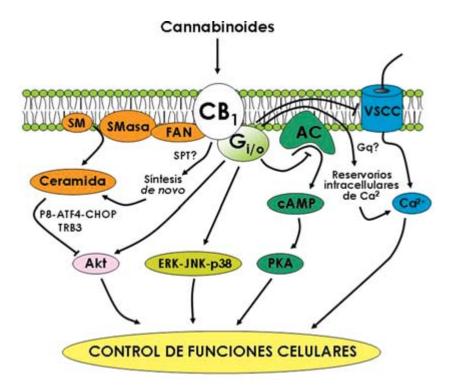


FIGURA 3. Mecanismos de señalización acoplados al receptor CB, cannabinoide. Los cannabinoides ejercen sus efectos a través de receptores acoplados a proteínas G, principalmente G_{io} . En concreto, el receptor CB_1 cannabinoide regula una gran variedad de sistemas de señalización celular. Entre estos efectos se incluyen los siguientes: (i) la inhibición de la vía de la adenilil ciclasa (AC)-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP)-proteína quinasa A (PKA); (ii) el control de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} libre, tanto por cierre de canales iónicos de membrana plasmática [por ejemplo canales de Ca^{2+} sensibles a potencial (voltage-sensitive Ca^{2+} channels, VSCC)] como por salida de Ca2+ de reservorios intracelulares como el retículo endoplásmico (probablemente vía proteínas G_a); (iii) la activación de cascadas de proteína quinasas activadas por mitógenos como ERK (quinasa regulada por señales extracelulares; extracellular signal-regulated kinase), JNK (quinasa del extremo N-terminal de c-Jun; c-Jun Nterminal kinase) y p38; (iv) la generación del esfingolípido ceramida a través de dos posibles mecanismos: la hidrólisis de esfingomielina (SM) vía activación de una esfingomielinasa (SMasa), con la posible participación de la proteína adaptadora FAN, y la síntesis de novo de ceramida, probablemente vía inducción de la serina palmitoiltransferasa (SPT); en las células tumorales, la acumulación de ceramida induce una respuesta de estrés de retículo endoplásmico que desencadena la inducción sucesiva de los factores de transcripción p8, ATF-4 (factor activador de la transcripción 4; activating transcription factor 4) y CHOP [proteína homóloga a CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP); C/EBP homologue protein] y de la pseudoquinasa TRB3 (homólogo de la proteína tribbles 3; tribbles homologue 3); (v) la modulación de la quinasa de supervivencia Akt, tanto directamente a través de la señalización dependiente de proteínas G_{ija} acopladas al receptor CB, como a través de la interacción con TRB3. Todos estos y otros mecanismos de señalización participan en el control de la funcionalidad celular por cannabinoides.

ciones de los (endo)cannabinoides. Los receptores CB₁ y CB₂ pertenecen a la principal clase de receptores del organismo (los receptores acoplados a proteínas G) y se acoplan principalmente a proteínas G_{i/o}, aunque también se ha descrito que en algunas situaciones pueden señalizar vía proteínas G_q (10, 11). A través de ambas, estos receptores modulan rutas de señalización intracelular de gran importancia como la vía de la adenilil ciclasa (AC)-adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP)-proteína quinasa A (PKA), cascadas de proteína quinasas activadas por mitógenos como ERK (quinasa regulada por señales extracelulares; *extracellular signal-regulated kinase*), la generación del esfingolípido ceramida y la vía de la quinasa Akt (10-12). Éstos y otros mecanismos de señalización, que se detallan en la Figura 3, participan en el control de la funcionalidad celular por el sistema endocannabinoide.

Como parece lógico suponer, únicamente los tejidos del organismo que poseen receptores específicos para cannabinoides son blanco de la acción de estos compuestos. En concreto, la mayor parte de los efectos de los cannabinoides, tanto sobre el sistema nervioso central como sobre diversas localizaciones periféricas, están mediados por el receptor CB₁, inicialmente denominado «receptor central de cannabinoides» pero que hoy sabemos posee una localización muy ubicua. Este receptor es especialmente abundante en áreas del sistema nervioso central implicadas en el control de la actividad motora (ganglios basales, cerebelo), memoria y aprendizaje (corteza, hipocampo), emociones (amígdala), percepción sensorial (tálamo) y diversas funciones autónomas y endocrinas (hipotálamo, médula), lo que lógicamente explica que los endocannabinoides modulen estos procesos y que el consumo de marihuana interfiera con ellos (10, 11) (Figura 4). El receptor CB₁ está presente también en las terminales nerviosas periféricas que inervan tanto la piel como los tractos digestivo, circulatorio y respiratorio, así como en numerosos tejidos y órganos como endotelio vascular, hueso, testículo, útero, ojo, hígado y tejido adiposo.

El receptor CB₂, inicialmente denominado «receptor periférico de cannabinoides», muestra una distribución más restringida que receptor CB₁, y está fundamentalmente presente en el sistema inmune, tanto en células (por ejemplo, linfocitos y macrófagos) como en tejidos (por ejemplo, bazo, apéndice y ganglios). Se piensa por ello que este receptor está implicado en la modulación de la respuesta inmune por el sistema endocannabinoide (10, 13).

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Los endocannabinoides, junto con sus receptores y sistemas específicos de síntesis y degradación, constituyen en el organismo el denominado sistema en-



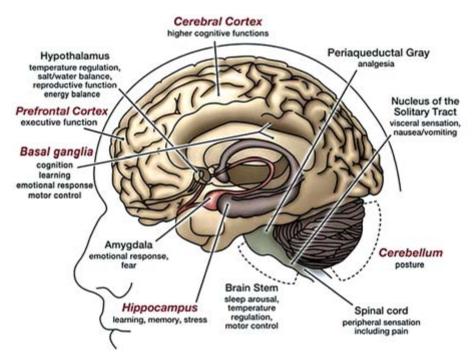


FIGURA 4. Expresión del receptor CB₁ cannabinoide en distintas regiones del sistema nervioso central. El receptor CB₁ cannabinoide constituye uno de los receptores más abundantes del sistema nervioso central, y se halla expresado en muy distintos tipos de neuronas de prácticamente todas sus regiones. Es particularmente abundante en el hipocampo (donde controla los procesos de aprendizaje y memoria), la corteza (donde controla el procesamiento de información cognitiva), el cerebelo (donde controla la actividad motora) y los ganglios basales (donde controla el comportamiento motor y otros procesos muy diversos). Además, en la amígdala modula las emociones, en el tronco cerebral y la medula espinal controla la respuesta nociceptiva, en el sistema mesolímbico dopaminérgico participa en los procesos motivacionales y de recompensa, en el hipotálamo regula la ingesta, etc. Original disponible en http://www.endocannabinoid.net.

docannabinoide o sistema cannabinoide endógeno. Este sistema (o al menos parte de sus componentes) aparece de forma altamente conservada en la gran mayoría de animales, al menos en todos los deuteróstomos, y su función hasta ahora mejor establecida es la de constituir un mecanismo de neuromodulación en el sistema nervioso central de los mamíferos (14, 15). Así, cuando se activan receptores de neurotransmisores en la membrana plasmática de una neurona

AEA PLD NAPE IR PLD NAPE IR PLD PAAH Degradación

Neurona postsináptica

FIGURA 5. Papel neuromodulador de la anandamida. La ocupación de receptores postsinápticos de diversos neurotransmisores (NT), particularmente receptores ionotrópicos (iR) de glutamato, eleva la concentración citoplasmática de Ca²+ libre, lo cual induce (i) la activación de N-aciltransferasas que generan precursores fosfolipídicos de anandamida (AEA) como la N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) y (ii) la subsecuente hidrólisis de NAPE por diversas lipasas, entre las que destaca una fosfolipasa D (PLD) de NAPE. Se ha descrito así mismo la localización presináptica de la NAPE-PLD, lo que implicaría la posible generación presináptica de AEA (señalada con interrogación). La AEA actúa sobre receptores CB1 presinápticos, que están acoplados al cierre de canales de Ca²+ sensibles a potencial y a la apertura de canales rectificadores de K+. Ello hiperpolariza la membrana plasmática e inhibe la secreción de NTs. La acción de la AEA finaliza mediante la recaptura por un sistema de transporte de membrana (T) aún no completamente caracterizado y una familia de enzimas intracelulares entre las que destaca la amidohidrolasa de ácidos grasos (fatty acid amide hydrolase, FAAH), de localización preferentemente postsináptica y que degrada la AEA a ácido araquidónico y etanolamina. +, activación; -, inhibición.

postsináptica, ésta sintetiza precursores de endocannabinoides y los escinde para liberar a la hendidura sináptica endocannabinoides funcionalmente activos. Esto acontece, por ejemplo, tras la unión de algunos neurotransmisores como el glu-

Neurona postsináptica

Figura 6. Papel neuromodulador del 2-araquidonoilglicerol. La ocupación de receptores postsinápticos de diversos neurotransmisores (NT), particularmente receptores metabotrópicos (mR) de glutamato, induce (i) la disociación de proteínas G_q heterotriméricas y (ii) la activación de la fosfolipasa Cβ, (PLCβ), que hidroliza precursores fosfolipídicos de membrana como el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato para rendir sn-1,2-diacilgliceroles (DAG), entre ellos los que poseen un grupo araquidonoilo en posición sn-2. Éstos son hidrolizados por la sn-1-diacilglicerol lipasa (DAGL) para generar 2-araquidonoilglicerol (2-AG). El 2-AG actúa sobre receptores CB₁ presinápticos, que están acoplados al cierre de canales de Ca²+ sensibles a potencial y a la apertura de canales rectificadores de K+. Ello hiperpolariza la membrana plasmática e inhibe la secreción de NTs. La acción del 2-AG finaliza mediante la recaptura por un sistema de transporte de membrana (T) aún no caracterizado y una familia de enzimas intracelulares entre las que destaca la monoacilglicerol lipasa (MAGL), de localización preferentemente presináptica y que degrada 2-AG a ácido araquidónico y glicerol. +, activación; -, inhibición.

tamato a sus receptores ionotrópicos o metabotrópicos. Los endocannabinoides actúan entonces como mensajeros químicos retrógrados, esto es, se unen a receptores CB₁ de la neurona presináptica, lo que conlleva por ejemplo que se dificulte la entrada de iones Ca²⁺ (por cierre de canales de Ca²⁺ sensibles a po-

tencial; VSCCs, *voltage-sensitive Ca*²⁺ *channels*) y se facilite la salida de iones K⁺ (por la apertura de canales rectificadores de K⁺ sensibles a proteínas G). Ello impide la despolarización de la membrana y los procesos exocitosis, y así se bloquea la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el ácido γ-aminobutírico (GABA). La acción neuromoduladora de los endocannabinoides finaliza mediante su recaptura celular a través de sistemas de transporte de membrana plasmática y su posterior degradación intracelular, que corre a cargo de una variada familia de lipasas entre las cuales la amidohidrolasa de ácidos grasos (*fatty acid amide hydrolase*, FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) son las mejor caracterizadas para la AEA y el 2-AG, respectivamente. En las Figuras 5 y 6 se detallan las características de los procesos de señalización retrógrada en los que participan la AEA y el 2-AG.

El receptor CB₁ cannabinoide es en general uno de los tipos de receptores más altamente expresados en el sistema nervioso central y, en concreto, el receptor presináptico acoplado a proteínas G más abundante en el cerebro adulto, hallándose presente en muy distintos tipos de neuronas de prácticamente todas las regiones de este órgano (Figura 4). La localización presináptica del receptor CB₁ cannabinoide fue mostrada por vez primera en terminales axonales de interneuronas hipocampales, y hoy en día se conocen numerosos ejemplos de otras neuronas GABAérgicas (por ejemplo, corticales y estriatales), así como glutamatérgicas (por ejemplo, corticales, hipocampales, hipotalámicas y cerebelares) o de vías subcorticales ascendentes (por ejemplo, terminales colinérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas), que expresan altas cantidades de receptores CB₁ presinápticos (15). Aunque el resultado global de la activación de dichos receptores es la retroinhibición de la liberación de neurotransmisores y la consiguiente atenuación de la transmisión sináptica, el curso temporal en el que tiene lugar este proceso divide los efectos de los endocannabinoides sobre la plasticidad sináptica en dos grandes tipos, que pueden además poseer distintas implicaciones patofisiológicas (16). Así, la depresión sináptica a corto plazo se inicia muy rápidamente (< 1 s) y su duración es muy corta (s-min), mientras que la depresión sináptica a largo plazo requiere periodos más largos de inducción (s-min) y su duración es más larga (h). Aunque ambos procesos están mediados por la activación de receptores CB₁ presinápticos, los mecanismos señalizadores responsables de cada uno de ellos son diferentes. Así, la depresión a corto plazo suele implicar la inhibición de canales de Ca²⁺ y la apertura de canales de K⁺ en la membrana plasmática (Figuras 5 y 6), mientras que la depresión a largo plazo depende de la inhibición de la vía AC-cAMP-PKA (Figura 3) y consecuentemente de la inactivación de algunas proteínas blanco de esta ruta como RIM-1α (molécula que interacciona con Rab3 1 α ; Rab3-interacting molecule-1 α).

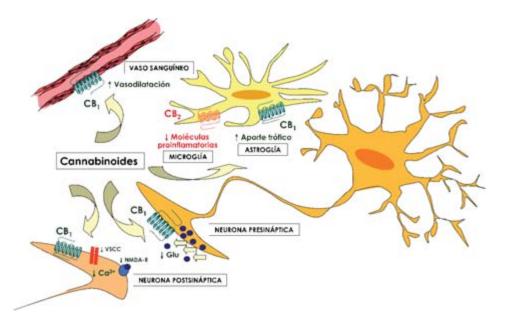


Figura 7. Expresión de receptores cannabinoides en distintas localizaciones celulares del sistema nervioso central. Los endocannabinoides actúan como mensajeros retrógados y controlan a través de receptores CB₁ presinápticos la liberación de neurotransmisores como el glutamato (ver más detalles en las Figuras 5 y 6). Se ha descrito además la existencia de receptores CB₁ postsinápticos, cuya activación inhibiría la actividad de canales de Ca²⁺ sensibles a potencial (voltage-sensitive Ca²⁺ channels, VSCC) y de receptores ionotrópicos de glutamato (tipo N-metil-D-aspartato, NMDA). Los receptores CB₁ se expresan también en astrocitos, donde podrían controlar el aporte de nutrientes a las neuronas, así como en células del endotelio vascular, donde su activación induce vasodilatación. Por último, los receptores CB₂ cannabinoides se expresan en células de microglía, donde median la inactivación de dichas células y por tanto un descenso en la liberación de moléculas proinflamatorias. Figura original cortesía del Prof. Javier Fernández-Ruiz y la Dra. Sara González (Universidad Complutense de Madrid).

Además de esta localización característica en terminales presinápticas, se ha descrito la existencia de receptores CB₁ en neuronas postsinápticas, cuya activación inhibiría la actividad de VSCCs y de receptores ionotrópicos de glutamato (tipo *N*-metil-D-aspartato, NMDA) (Figura 7). En el cerebro los receptores CB₁ se expresan también en astrocitos, donde podrían controlar el aporte de nutrientes a las neuronas y mediar procesos de intercomunicación sináptica entre ambos tipos de células, así como en células del endotelio vascular, donde su activación induce vasodilatación. Por último, los receptores CB₂ cannabinoides se expresan en células de microglía, donde median la inactivación de dichas células y por tanto un descenso en la liberación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo que conlleva a su vez una ate-

nuación de los procesos neuroinflamatorios (17, 18) (Figura 7). Todos estos efectos complementan la acción de mensajeros retrógrados que ejercen los cannabinoides sobre la plasticidad sináptica y la funcionalidad neuronal.

El sistema endocannabinoide no sólo se expresa en el sistema nervioso adulto, sino que también lo hace en el cerebro en desarrollo, en el cual evidencia un patrón de distribución «atípico», ya que, por ejemplo, durante etapas prenatales los receptores CB₁ abundan en células progenitoras neurales y en proyecciones axonales que conforman áreas de sustancia blanca (19, 20). Estudios recientes sugieren que, durante el desarrollo cerebral, el sistema endocannabinoide controla procesos esenciales como la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de células neurales, así como la elongación y fasciculación de axones y la formación de conexiones sinápticas durante el establecimiento de los patrones morfogenéticos del sistema nervioso (20). Una reminiscencia de ese papel del sistema endocannabinoide durante el desarrollo podría ser su presencia y actividad funcional en células progenitoras residentes en regiones neurogénicas del cerebro adulto como la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo (21).

POSIBLES APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS CANNABINOIDES

La marihuana y sus preparados se han empleado en medicina desde hace al menos cincuenta siglos. Además, los descubrimientos recientes en el conocimiento del sistema endocannabinoide han contribuido al renacimiento del estudio de sus posibles propiedades terapéuticas, lo que constituye hoy en día un campo de amplio debate científico y clínico (22, 23). Con base en la demostración de la función moduladora que los endocannabinoides ejercen sobre numerosas funciones cerebrales, se ha sugerido el potencial terapéutico que la manipulación farmacológica de sus niveles o la administración de agonistas cannabinoides (bien fitocannabinoides, bien cannabinoides sintéticos) podría tener en el tratamiento de diversas patologías que afectan al sistema nervioso. En algunas de estas enfermedades ya se ha podido poner de manifiesto que existen cambios en la expresión de receptores cannabinoides y/o en los niveles de endocannabinoides en ciertas zonas del cerebro, lo que justificaría el estudio farmacológico de este sistema (22, 23). Por ejemplo, y de forma general, los cannabinoides ejercen efectos analgésicos que los harían de utilidad en el tratamiento del dolor (24). También podrían ser útiles en el tratamiento de los procesos de neuroinflamación, en la que su administración permitiría paliar algunas consecuencias típicas de dichos desórdenes (18). Hoy en día sabemos además que, bajo determinadas circunstancias, los cannabinoides son capaces de proteger a las neuronas frente a diversas situaciones de daño, lo que podría tener interés para el tratamiento de episodios de daño cerebral agudo y quizás de enfermedades neurodegenerativas (25, 26). Su participación en los procesos de memoria y aprendizaje hace pensar que los cannabinoides podrían ser de utilidad en trastornos como la extinción de memorias aversivas en situaciones de estrés post-traumático (27). Análogamente, la presencia de receptores de cannabinoides en regiones del sistema límbico y el hipotálamo anterior permitiría que en este caso el bloqueo de dichos receptores pueda ser una aproximación farmacológicamente relevante en el tratamiento de trastornos alimentarios y metabólicos (28) y de fenómenos compulsivos relacionados con la adicción a drogas (29, 30).

A pesar de todo ello, la utilización clínica de los cannabinoides y otros compuestos que afectan a la señalización cannabinérgica es hoy en día bastante restrictiva. En la actualidad se permite en algunos países la prescripción de cápsulas de THC (Marinol®) y del cannabinoide sintético nabilona (Cesamet®), así como la dispensa de marihuana medicinal, para inhibir la nausea y el vómito y estimular el apetito en pacientes de sida o cáncer tratados con agentes quimioterapéuticos emetógenos (12, 31). Entre otros posibles usos de los cannabinoides, cuyo estudio se encuentra en su mayoría en fase III de ensayos clínicos, podríamos destacar el tratamiento del dolor (el Sativex®, un aerosol oro-mucosal que contiene THC y cannabidiol, ha sido registrado recientemente en Canadá para el tratamiento del dolor neuropático asociado a la esclerosis múltiple y el dolor oncológico resistente a opioides) (32), la atenuación de los trastornos del movimiento (espasmos y temblores) asociados a la esclerosis múltiple (32) y la recuperación neurológica posterior a un traumatismo craneal (33). Por otro lado, un antagonista selectivo de los receptores CB, (Acomplia[®]) ha sido aprobado en la Unión Europea como tratamiento adyuvante (junto con la dieta y el ejercicio físico) de la obesidad (34). En la Figura 8 se detallan los medicamentos hoy en día disponibles basados en cannabinoides y el estado de las principales investigaciones clínicas sobre estos compuestos.

No debemos olvidar en cualquier caso que, aunque los cannabinoides sean sustancias bastante seguras en el contexto de su aplicación clínica, su uso médico está en parte dificultado por sus efectos psicoactivos no deseados, entre los que se incluyen los de tipo afectivo (euforia), somático (somnolencia, descoordinación motora), sensorial (alteraciones en la percepción temporal y espacial, desorientación) y cognitivo (lapsos de memoria, confusión) (23, 35). Aunque dichos efectos secundarios puedan ser transitorios y estar dentro de los márgenes

Manuel Guzmán e Ismael Galve-Roperh



EFECTO	POSIBLE APLICACIÓN TERAPÉUTICA (fase)
Inhibición de la emesis y	Quimioterapia de cáncer y sida
estimulación del apetito	(Marinol, Cesamet y marihuana medicinal aprobados)
Analgesia	Dolor (fase III con THC; Sativex aprobado)
Hipomotilidad y	Esclerosis múltiple
antiespasticidad	(fase III con THC y Sativex)
Neuroprotección	Traumatismo craneal e ictus (fase III con dexanabinol)
Inhibición de la ingesta y	Obesidad
aumento del catabolismo	(Acomplia aprobado)

Figura 8. Posibles aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides. El efecto terapéutico mejor establecido hoy en día de los cannabinoides es la inhibición de la náusea y el vómito en pacientes de cáncer y sida tratados con agentes quimioterapéuticos. Los cannabinoides también pueden aumentar el apetito, inhibir el dolor, atenuar los trastornos del movimiento (espasmos y temblores) asociados a enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple y quizás ser agentes neuroprotectores. Por otro lado, el bloqueo de los receptores CB₁ podría ser de utilidad terapéutica en el tratamiento de la obesidad y trastornos metabólicos.

aceptados para otros medicamentos, está claro que al menos para determinados pacientes y patologías sería deseable diseñar cannabinoides que carecieran de acciones psicotrópicas. Puesto que éstas dependen de los receptores CB₁ centrales, la opción más lógica es evitar la activación de dichos receptores (siempre que la patología en cuestión lo haga viable). Así, se está intentando diseñar compuestos que se unan selectivamente al receptor CB₂ o compuestos que no atraviesen la barrera hematoencefálica y por tanto no alcancen el sistema nervioso central (22, 23). Por otro lado, la administración a animales de experimentación de inhibidores de la degradación (recaptura o hidrólisis intracelular) de endocannabinoides ha permitido conseguir la elevación de los niveles de estos compuestos en contextos espacio-temporales restringidos y de esta manera la inducción de efectos bradiquinésicos, ansiolícos o analgésicos sin efectos se-

cundarios notorios (36). Este tipo de compuestos no ha sido aún objeto de ensayos clínicos.

La comunidad científica se encuentra hoy en día en un punto en el cual se ha acumulado un conocimiento relativamente bueno de cómo actúan molecularmente los (endo)cannabinoides en el organismo y de cuáles pueden ser algunas de sus aplicaciones terapéuticas más inmediatas. Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigación básica más profunda y ensayos clínicos más exhaustivos para comprender más sólidamente la función biológica y relevancia terapéutica de estos nuevos mensajeros químicos de nuestro organismo.

AGRADECIMIENTOS

La investigación de nuestro grupo está actualmente financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto SAF2006-00918), la Comunidad de Madrid (proyecto SAL2006/261) y la Universidad Complutense de Madrid (proyecto 950344). Agradecemos a todos nuestros compañeros de laboratorio su excelente labor y constante apoyo.

REFERENCIAS

- (1) Pertwee, R.G. (2008) The diverse CB_1 and CB_2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* 153: 199-215.
- (2) GAONI, Y. Y MECHOULAM, R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1646-1647.
- (3) DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A. Y MECHOULAM, R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258: 1946-1949.
- (4) MECHOULAM, R.; BEN SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N.E.; SCHATZ, A.R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B.R.; COMPTON, D.R.; PERTWEE, R.G.; GRIFFIN, G.; BAYEWITCH, M.; BARG, J. Y VOGEL, Z. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50: 83-90.
- (5) SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A. Y WAKU, K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 89-97.

Manuel Guzmán e Ismael Galve-Roperh

- (6) Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C. y Bonner, T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346: 561-564.
- (7) Munro, S.; Thomas, K.L. y Abu Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365: 61-65.
- (8) Pertwee, R,G. (2007) GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.* 152: 984-986.
- (9) STAROWICZ, K.; CRISTINO, L. Y DI MARZO, V. (2008) TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Curr. Pharm. Des.* 14: 42-54.
- (10) HOWLETT, A.C.; BARTH, F.; BONNER, T.I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; DEVANE, W.A.; FELDER, C.C.; HERKENHAM, M.; MACKIE, K.; MARTIN, B.R.; MECHOULAM, R. Y PERTWEE, R.G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54: 161-202.
- (11) MACKIE, K. (2008) Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol. Cell. Endo-crinol.* 286: S60-S65.
- (12) GUZMÁN, M. (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* 3: 745-755.
- (13) KLEIN, T,W. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 400-411.
- (14) PIOMELLI, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 873-884.
- (15) Katona, I. y Freund, T.F. (2008) Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* 14: 923-930.
- (16) CHEVALEYRE, V.; TAKAHASHI, K.A. Y CASTILLO, P.E. (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 37-76.
- (17) Fernández-Ruiz, J.; Romero, J.; Velasco, G.; Tolón, R.M.; Ramos, J.A. y Guzmán, M. (2007) Cannabinoid CB₂ receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.* 28: 39-45.
- (18) Baker, D.; Jackson, S.J. y Pryce, G. (2007) Cannabinoid control of neuroin-flammation related to multiple sclerosis. *Br. J. Pharmacol.* 152: 649-654.
- (19) FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BERRENDERO, F.; HERNÁNDEZ, M.L. Y RAMOS, J.A. (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci*. 23: 14-20.
- (20) HARKANY, T.; GUZMÁN, M.; GALVE-ROPERH, I.; BERGHUIS, P.; DEVI, L.A. Y MACKIE, K. (2007) The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol. Sci.* 28: 83-92.

- (21) GALVE-ROPERH, I.; AGUADO, T.; PALAZUELOS, J. Y GUZMÁN, M. (2007) The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist*. 13: 109-114.
- (22) Mackie, K. (2006) Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46: 101-122.
- (23) PACHER, P.; BATKAI, S. Y KUNOS, G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 58: 389-462.
- (24) HOHMANN, A.G. Y SUPLITA, R.L. (2006) Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* 8: E693-E708.
- (25) MECHOULAM, R. Y SHOHAMI, E. (2007) Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.* 36: 68-74.
- (26) GALVE-ROPERH, I; AGUADO, T.; PALAZUELOS, J. Y GUZMÁN, M. (2008) Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr. Pharm. Des.* 14: 2279-2288.
- (27) Lutz, B. (2007) The endocannabinoid system and extinction learning. *Mol. Neurobiol.* 36: 92-101.
- (28) Jesudason, D. y Wittert, G. (2008) Endocannabinoid system in food intake and metabolic regulation. *Curr. Opin. Lipidol*. 19: 344-348.
- (29) MALDONADO, R.; VALVERDE, O. Y BERRENDERO, F. (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29: 225-232.
- (30) Соlombo, G.; Orrù, A.; Lai, P.; Cabras, C.; Maccioni, P.; Rubio, M.; Gessa, G.L. Y Carai, M.A. (2007) The cannabinoid CB₁ receptor antagonist, rimonabant, as a promising pharmacotherapy for alcohol dependence: preclinical evidence. *Mol. Neurobiol.* 36: 102-112.
- (31) SLATKIN, N.E. (2007) Cannabinoids in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting: beyond prevention of acute emesis. *J. Support. Oncol.* 5: 1-9.
- (32) SMITH, P.F. (2007) Symptomatic treatment of multiple sclerosis using cannabinoids: recent advances. *Expert Rev. Neurother.* 7: 1157-1163.
- (33) Maas, A.I.; Murray, G.; Henney, H.; Kassem, N; Legrand, V.; Mangelus, M.; Muzelaar, J.P.; Stocchetti, N.; Knoller, N. y Pharmos TBI Investigators (2006) Efficacy and safety of dexanabinol in severe traumatic brain injury: results of a phase III randomised, placebo-controlled, clinical trial. *Lancet Neurol*. 5: 38-45.
- (34) WRIGHT, S.M.; DIKKERS, C. Y ARONNE, L.J. (2008) Rimonabant: new data and emerging experience. *Curr. Atheroscler. Rep.* 10: 71-78.
- (35) IVERSEN, L. (2005) Long-term effects of exposure to cannabis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 69-72.
- (36) DI MARZO, V. (2008) Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 438-455.

7. Regulación transcripcional dependiente de calcio en el sistema nervioso

JOSÉ RAMÓN NARANJO Y ROSA GÓMEZ-VILLAFUERTES

RESUMEN

El aumento en la concentración intracelular de Ca²⁺ que se produce en la neurona postsináptica como consecuencia de la actividad nerviosa desencadena una cascada de señalizaciones que, en última instancia, se manifiesta como cambios en la expresión de genes específicos. El control de la expresión génica por calcio es un fenómeno altamente regulado y desempeña un papel vital en la funcionalidad de múltiples procesos nerviosos tales como la morfogénesis axo-dendrítica, el desarrollo de la sinapsis, la supervivencia neuronal y la adquisición de las respuestas adaptativas que subyacen a los procesos de aprendizaje y de memoria que se producen en el cerebro adulto. En esta revisión se enumerarán las proteínas decodificadoras de la señal de calcio que ejercen un papel crítico a nivel nuclear regulando la actividad de diferentes vías transcripcionales. También se analizará en modelos *in vivo* la repercusión fisiológica que conlleva la modificación de los genes que codifican dichas proteínas sensoras de Ca²⁺, destacando la importancia de los mecanismos transcripcionales regulados por calcio en la funcionalidad y especificidad celular.

Palabras clave: Factores de transcripción. Calcineurina. Ca²⁺/calmodulina quinasas. Sensores de calcio. Histonas.

ABSTRACT

Calcium-dependent transcriptional regulation in the nervous system

The calcium signal is used by all living organisms to distribute information essential to regulate many different cellular functions. In neurons, signaling

through calcium ions is particularly relevant and sophisticated, with a multitude of specialized proteins serving to finely tune calcium free concentrations in specific microdomains or organelles. In this article we will summarize the information about well known proteins that sense and decode the calcium signal and are key elements in the nucleus to regulate the activity of various transcriptional networks. When possible, the review will also present *in vivo* models in which the genes encoding these calcium sensors-transducers have been modified, to emphasize the critical role of these Ca²⁺-operated mechanisms in many physiological functions.

Keywords: Transcription factors. Calcineurin. Ca²⁺/calmodulin kinases. Calcium sensors. Histones.

El esclarecimiento de los mecanismos moleculares que correlacionan los niveles intracelulares de calcio libre con la expresión de genes específicos ha supuesto uno de los objetivos principales en el ámbito de la Neuroquímica molecular. Este conocimiento se ha visto dificultado por la elevada complejidad de la regulación transcripcional mediada por calcio, que es dependiente i) de la dinámica temporal de la señal de calcio, ii) de los microdominios subcelulares donde se genera la señal y iii) de la naturaleza de la señal de calcio intranuclear.

i) En la mayoría de las células, sean o no de carácter excitable, la activación de los receptores de membrana genera oscilaciones en los niveles intracelulares de calcio que desde un principio se han interpretado como un «código» que explicaría la gran variabilidad de respuestas biológicas que se inducen en diferentes

Abreviaturas: NFAT, factor nuclear de las células T activadas; NFkB, factor nuclear kappa-B; CREB, proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico; BDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro; IP3, inositol-3-fosfato; PKC, proteína quinasa C; CaMK, calmodulina-quinasa; PP1, proteína fosfatasa 1; CaM, calmodulina; LTP, potenciación a largo plazo; CBP, proteína de unión a CREB; IKK, IkB quinasa; HAT, histona acetiltransferasa; AKAP79, proteína-79 de anclaje a quinasa A; GSK-3, glicógeno sintasa quinasa 3; TORC, transductor de la actividad regulada de CREB; MEF-2, factor-2 activador de miocitos; HDAC, histona desacetilasa; CRE, elementos de respuesta a AMPc; bZIP, dominio de unión/dimerización al ADN; DREAM, modulador antagonista de los elementos de respuesta "downstream"; KID, dominio inducible por quinasa; MITR, represor transcripcional de interacción con MEF-2; CCDV, canales de calcio dependientes de voltaje; CK1, caseína quinasa I; DYRK, quinasa regulada por fosforilación en tirosina de doble especificidad; KChIP, proteína de interacción con canales de potasio; LCD, dominio rico en leucina y aminoácidos cargados; EFmDREAM, proteína DREAM mutada en manos-EF; NCX3, intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ de membrana tipo 3; CGN, neuronas granulares de cerebelo; CREST, transactivador de respuesta a calcio; CCAT, regulador transcripcional asociado a un canal de calcio; Sox, caja HMG relacionada con Sry; HMG, grupo de proteínas de alta movilidad; MSK, quinasa activada por estrés y mitógenos.

sistemas celulares. En la naturaleza oscilatoria de la señal de calcio la frecuencia, más que la amplitud, parece ser el origen del código de información. En 1998, los grupos de Lewis y Tsien demostraron en paralelo cómo una oscilación de alta frecuencia era capaz de inducir la trascripción dependiente del factor nuclear de las células T activadas (NFAT) y del factor nuclear kappa-B (NFκB) mientras que una baja frecuencia sólo regulaba la expresión mediada por NFκB (1, 2).

- ii) El lugar físico en el que se produce la entrada de calcio, denominados habitualmente microdominios, también juega un papel fundamental en la naturaleza de la señal de calcio (3, 4). En neuronas, la entrada de calcio a través de los receptores sinápticos de NMDA induce la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB) y la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), mientras que la activación de los receptores extrasinápticos de NMDA bloquea dichos efectos (5). Esto significa que la expresión de BDNF se encuentra regulada por al menos dos mecanismos diferentes activados por calcio pero acoplados a cascadas de señalización específicas que producen efectos biológicos opuestos. Recientemente Hardingham y colaboradores han incrementado la complejidad de este sistema al describir que la activación de los receptores de NMDA sinápticos puede conferir neuroprotección a corto o largo plazo dependiendo de la ruta de señalización a la que se encuentren acoplados: la activación de la cascada fosfoinositol 3-quinasa/Akt o la activación de CREB y el aumento del calcio intranuclear, respectivamente (6).
- iii) La regulación transcripcional dependiente de calcio requiere necesariamente la presencia de Ca²⁺ dentro del núcleo. En un principio se pensaba que los iones podían difundir libremente desde el citosol hacia el núcleo, y viceversa, a través de los poros nucleares. Sin embargo, cada día existen más evidencias que apoyan la existencia de una homeostasis regulada del Ca²⁺ intranuclear independiente de los niveles de calcio citosólico (7-9). Conceptualmente esta hipótesis tiene una gran relevancia ya que implica la existencia de mecanismos que regulan tanto la salida de calcio nuclear como la presencia de microdominios de calcio dentro del núcleo que podrían modificar de forma específica la estructura de la cromatina y la expresión génica. Recientemente se ha identificado la presencia de un retículo nucleoplásmico que se continúa con el retículo endoplásmico y con la envuelta nuclear. Este retículo posee receptores de inositol-3-fosfato (IP3) que median pequeños incrementos de calcio en microdominios subnucleares concretos, donde se produce la translocación de la proteína quinasa nuclear C-γ (PKC-γ) a la envuelta nuclear sin que se vea modificada la distribución citosólica de la proteína PKC (10).

A continuación, se resumen los mecanismos descritos hasta el momento que median la regulación de la expresión génica dependiente de calcio, ya sea a través de mecanismos intracelulares generales o de señales específicas en compartimentos subnucleares.

1. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL POR PROTEÍNAS QUINASAS/FOSFATASAS DEPENDIENTES DE CALCIO

Se han descrito y caracterizado en profundidad diferentes proteínas quinasas y fosfatasas que al ser activadas directa o indirectamente por cambios en los niveles intracelulares de calcio libre ejercen su acción sobre sustratos que a su vez pueden modificar la expresión de multitud de genes. En esta revisión nos centraremos en cuatro grupos principales de proteínas: por un lado las calmodulina-quinasas (CaMKs) y las PKC «convencionales» y por otro las proteínas fosfatasas PP1 y PP2B, más conocida como calcineurina.

A. Calmodulina-quinasas

Las CaMKs (CamKI, II y IV) son serina/treonina quinasas que presentan en su extremo amino una subunidad catalítica y un domino C-terminal regulador que contiene el sitio de unión para la Ca²⁺/calmodulina (CaM) y un dominio de autoinhibición. A diferencia de las CaMKI y IV, que son enzimas monoméricas, la CaMKII posee un dominio de asociación que le permite formar estructuras multiméricas. Hasta la fecha se han caracterizado cuatro isoformas de la CaMKII: α y β , que se expresan preferentemente en neuronas, γ y δ , que se expresan en células somáticas (11). Las CaMKs se encuentran reguladas por fosforilación, aunque los mecanismos implicados difieren entre ellas. Mientras la CaMKI y la CaMKIV son fosforiladas por las proteínas quinasas CaMKKα y β, la CaMKII se autofosforila en el residuo Thr-286. Como consecuencia, la afinidad de la fosfoCaMKII por la CaM aumenta 1000 veces, convirtiéndola en un enzima parcialmente independiente de la Ca²⁺/CaM (12). El hecho de que la CaMKII se mantenga activa una vez finalizado el estímulo, ha permitido proponerla como la molécula «memoria» mediadora de los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) de la actividad sináptica (13). La actividad enzimática de la CaMKII finaliza por acción de fosfatasas específicas y/o por autofosforilación en los residuos Thr-305 y Thr-306 que bloquean la unión de la CaM.

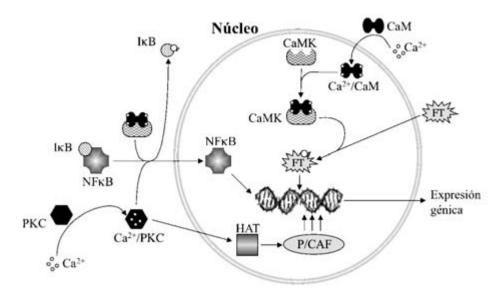


Figura 1. Control de la actividad transcripcional por proteínas quinasas dependientes de calcio. El esquema representa las principales vías transcripcionales que se encuentran reguladas por Ca^{2+} /calmodulina quinasas (CaMKs) y proteínas quinasa C (PKC) «convencionales» dependientes de Ca^{2+} y diacilglicerol. Las CaMKs modifican la actividad de diversos factores de transcripción (FT) entre los que se incluyen CREB, CBP, Ets-1 y NF kB. Las PKC también regulación la actividad de NF kB y de proteínas nucleares como CBP y P/CAF.

Las CaMKs pueden fosforilar muy diversos sustratos, entre los que se incluyen factores de transcripción que regulan la expresión de un gran número de genes como CREB, CBP (proteína de unión a CREB), Ets-1 y NF-κB (Figura 1). La modificación génica de alguna CaMK tiene como consecuencia la aparición de alteraciones fenotípicas muy graves en el individuo portador. Por ejemplo, la deficiencia del gen que codifica la isoforma CaMKIIα reduce la LTP en hipocampo y la plasticidad de la corteza visual primario (14, 15), también produce un comportamiento agresivo y una respuesta anormal ante el miedo (16) e incrementa el daño neuronal post-isquémico (17).

B. Proteínas quinasas C dependientes de Ca2+

La familia de las PKCs está formada por un grueso número de serina/treonina quinasas que se encuentran implicadas en múltiples procesos celulares como son la proliferación y diferenciación celulares, la respuesta inmune, la regulación transcripcional, la transmisión sináptica y los fenómenos de aprendizaje y memoria. Esta familia se compone de 12 isoenzimas que se subdividen en 3 grandes grupos en función de su estructura y características de activación: PKCs clásicas o «convencionales», PKCs «nuevas» y PKCs «atípicas» (18). Las PKCs clásicas (α , β I, β II, γ) son activadas por Ca²+ y diacil-glicerol (DAG) o ésteres de forbol (PE), mientras que las PKCs nuevas (δ , ϵ , η , θ) no son reguladas por Ca²+ pero se activan por DAG y PE. Tanto las PKCs clásicas como las nuevas presentan un par de dominios en dedos de zinc en su región reguladora. A diferencia de éstas, las PKC atípicas (ζ I, ζ II, ι/λ , μ) no son activadas ni por Ca²+ ni por DAG o PE y sólo presentan un dedo de zinc en el dominio regulador.

Como se ha mencionado previamente, un incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ produce la activación de las PKCs clásicas y su reclutamiento hacia la cara interna de la membrana plasmática o de la envuelta nuclear en pocos minutos. Este proceso se encuentra asociado a una modulación de la expresión génica mediante dos mecanismos principales: la fosforilación de la IkB quinasa (IKK) y un aumento en la actividad de las histona acetiltransferasas nucleares (HAT) (Figura 1). En el primer caso, la fosforilación de la IKK produce su activación y la consecuente translocación nuclear del factor de transcripción NF-κB, que induce la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión y enzimas como la ciclooxigenasa-2 y la óxido nítrico sintasa, entre otras (19, 20). Respecto al segundo mecanismo, el incremento en la actividad de las HAT nucleares se ha relacionado con la acetilación específica de una serie de proteínas nucleares como CBP y P/CAF (21). En ratones deficientes de PKC-γ se observa una clara alteración de la transmisión sináptica en el hipocampo y una inervación aberrante de las neuronas de Purkinje procedente de las fibras trepadoras de la corteza cerebelosa (22, 23).

C. Calcineurina o proteína fosfatasa 2B

La calcineurina es una serina/treonina fosfatasa activada por Ca²+/CaM constituida por una subunidad catalítica que contiene el sitio de unión a la calmodulina y una subunidad reguladora que une calcio. Presenta una afinidad por la Ca²+/CaM de más de un orden de magnitud superior a la descrita para la CaM-KII. Así, la calcineurina es activada preferentemente por incrementos de calcio sostenidos y de poca magnitud, mientras que los picos de calcio transitorios y

de gran amplitud median fundamentalmente la expresión génica dependiente de la CaMKII (3, 24).

La actividad de la calcineurina se encuentra regulada por su interacción con diferentes proteínas endógenas. El primer inhibidor caracterizado fue la proteína-79 de anclaje a quinasa A (AKAP79), una proteína que permite el anclaje a membrana de la calcineurina junto con las proteínas quinasas A o C (25). Otros inhibidores como Cabin1/Cain, A238L y el regulador de la señalización por calmodulina (RCS) actúan bloqueando la unión de la calcineurina a sus substratos fisiológicos (26-29), mientras que la proteína CHP/p22 mimetiza la interacción de la calcineurina con su subunidad reguladora (30). Recientemente se ha descrito una nueva familia de reguladores de la calcineurina, los denominados RCAN-1, 2 y 3 (31, 32). La proteína RCAN-1, también denominada calcipresina-1, MCIP-1 y Adapt78, se expresa abundantemente en sistema nervioso central, donde interacciona con la subunidad catalítica de la calcineurina inhibiendo la vías de señalización dependientes de NFAT y MEF-2 (33). Curiosamente, la expresión de RCAN-1 se encuentra a su vez regulada por NFAT, indicando que este inhibidor puede actuar regulando los niveles endógenos de calcineurina activada. Cabe destacar que la fosforilación de RCAN-1 por la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) revierte su efecto inhibidor sobre la calcineurina (34) y que la activación de la vía de Notch1 también reprime la RCAN-1 a través de la proteína Hes-1 (35).

La calcineurina regula la actividad de al menos tres rutas transcripcionales de gran relevancia fisiológica que implican directamente a las proteínas NFAT, TORC (transductor de la actividad regulada de CREB) y MEF-2 (factor-2 activador en miocitos) (36). En el caso de NFAT y TORC, el efecto de la calcineurina se debe a una desfosforilación directa de estos factores, mientras que en el segundo caso, la calcineurina regula la actividad de MEF-2 mediante tres mecanismos diferentes que se discutirán detalladamente en la sección 2 (Figura 2). La calcineurina también puede modular la expresión génica al modificar la concentración intracelular de Ca²⁺ libre mediante la desfosforilación de fosfolamban, un regulador endógeno de la bomba de calcio SERCA2a, de los receptores de rianodina y del receptor de IP3 de tipo 1 (37-39). La calcineurina desempeña un papel fundamental en los fenómenos de plasticidad sináptica y memoria. En el hipocampo de ratones transgénicos que sobre-expresan la calcineurina activada se observa un retraso en la generación de la LTP que se corresponde con defectos en la memoria a largo plazo (40, 41). Por el contrario, la inhibición temporal de la calcineurina facilita la LTP en estos animales, observándose una mejora en el aprendizaje y en la memoria a corto y largo plazo (41).

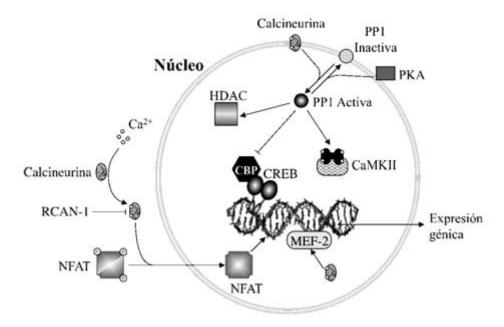


FIGURA 2. Control de la actividad transcripcional por proteínas fosfatasas dependientes de calcio. El esquema representa las principales vías transcripcionales que se encuentran reguladas por calcineurina y la proteína fosfatasa 1 (PP1). La calcineurina se encuentra implicada en la regulación de NFAT y MEF-2, mientras que la PP1 modula la actividad de CREB/CBP y de las enzimas histona desacetilasas (HDACs).

D. Proteína fosfatasa 1

La holoenzima PP1 es una serina/treonina fosfatasa dependiente de Ca²+/cal-cineurina constituida por una subunidad catalítica altamente conservada y una o más subunidades reguladoras. La actividad de la PP1 se encuentra modulada por su interacción con aproximadamente 70 proteínas auxiliares diferentes que dirigen el enzima hacia diversos compartimentos subcelulares, confiriéndole su especificidad de substrato (42, 43). Dentro de las proteínas auxiliares destacan un grupo de moléculas que se comportan como inhibidores de la PP1 bloqueando su actividad catalítica. Algunos ejemplos de estas proteínas son los inhibidores 1 y 2 de la PP1, DARPP-32, PNUTS y NIPP-1. La defosforilación del inhibidor 1 por la calcineurina o por la PP2A resulta en una activación de la PP1 calcio-dependiente o calcio-independiente, respectivamente (44). PNUTS y NIPP-1 son dos inhibidores que producen la localización y retención de la PP1 en el núcleo, re-

gulando así la actividad nuclear del enzima (45, 46). La fosforilación de PNUTS y NIPP-1 por la PKA regula tanto la unión de los inhibidores a la PP1 como el bloqueo de su actividad enzimática (47, 48). PNUTS también se une a la cromatina, incrementando la descondensación cromosómica dependiente de PP1 (49).

La desfosforilación de CREB y el consecuente bloqueo de la expresión génica dependiente de dicho factor es la función principal de la PP1 a nivel nuclear (Figura 2). Para ello PP1 interacciona específicamente con la histona desacetilasa 1 (HDAC1), produciéndose el reclutamiento de la fosfatasa a las proximidades de fosfoCREB para que éste sea desfosforilado (50). En ratones transgénicos, la sobreexpresión del inhibidor 1 de la PP1 prolonga el estado fosforilado de CREB (51) e incrementa la autofosforilación de la CaMKII en el residuo Thr-286 (52).

2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN REGULADOS POR CALCIO

En la actualidad, existe una larga lista de efectores nucleares cuya acción se encuentra regulada por cambios en la concentración intracelular de Ca²⁺, incluyendo tanto proteínas que son modificadas post-traduccionalmente de manera calcio dependiente, como moléculas cuya actividad o presencia nuclear está regulada por su interacción con dicho ión o con proteínas intermediarias que unen calcio.

A. CREB/CBP/TORC

Aunque la expresión génica dependiente de CREB es una de las vías de control transcripcional mejor conocidas y caracterizadas, en los últimos años se han descrito nuevos componentes y nuevas etapas dentro de este proceso de regulación que, en muchos casos, son estrictamente dependientes de los niveles de Ca²⁺ intracelular. En un principio se consideraba que el paso inicial en el proceso de regulación dependiente de CREB consistía en la unión de dímeros de CREB fosforilado a sitios específicos en el genoma denominados elementos de respuesta a AMPc (CRE). Sin embargo, los estudios de Goodman y colaboradores han puesto de manifiesto que la unión de CREB a un determinado sitio consenso CRE (5'-TGAGCTCA-3') se encuentra específicamente regulada en cada subtipo celular, representando una etapa importante en el control de la expresión génica (53). Además, tanto la configuración de la región promotora de los genes diana (por ejemplo, la existencia de una caja TATA y su proximidad a los sitios CRE) como el estado de metilación de los elementos CRE próximos al promotor son factores determinantes en la unión de CREB al promotor y en la consecuente proporción de genes diana que pueden ser regulados por

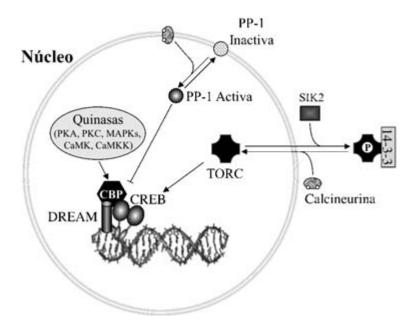


FIGURA 3. Regulación calcio dependiente de la expresión génica mediada por CREB. La actividad de CREB y/o su cofactor CBP se encuentra modulada por acción de diversas quinasas/fosfatasas así como por su interacción con las proteínas TORC y DREAM.

Ca²⁺/AMPc en un momento dado (54, 55). Por lo tanto, existen factores genéticos y epigenéticos que van a regular en primera instancia la expresión génica dependiente de CRE.

La fosforilación de CREB en el residuo de Ser-133 y su consiguiente activación, puede llevarse a cabo por acción de diferentes quinasas como son la PKA, la PKC, algunas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, ERK, p38), la CaMK y la CaMKK (Figura 3). Como se ha mencionado previamente, la activación de la PP1 dependiente de la Ca²+/calcineurina es la encargada de desfosforilar CREB y detener la transcripción dependiente de CRE (50). Por sí sola, la fosforilación de CREB no es suficiente para inducir la expresión de los genes diana, siendo necesario el reclutamiento de proteínas coactivadoras como CBP/p300 (56). La unión de CBP/p300 a fosfoCREB se encuentra a su vez modulada por la fosforilación dependiente de Ca²+ y de CaMKIV de CBP en el residuo Ser-301, tal y como se observa tras la activación de los receptores de NMDA en cultivos primarios de neuronas hipocampales (57, 58). Sin embargo, la mutación puntual de dicho residuo de serina reduce pero no bloquea por com-

pleto la transactivación dependiente de CREB/CBP, indicando que deben existir otros sitios de fosforilación por CaMKIV (especialmente en la región carboxilo terminal de CBP), o por otras quinasas como CaMKII, implicados en el reclutamiento de CBP. No se conoce con exactitud cómo la fosforilación de CBP afecta a la transactivación de los genes diana, aunque se ha sugerido que puede estar modificando la actividad de HAT, tal y como se había descrito previamente para la proteína P/CAF (21). Así, tanto en ratones heterocigotos para CBP (CBP+/-) como en ratones que expresan de manera inducible una forma mutante de CBP que carece de actividad HAT, se observa una disfunción en la acetilación de la cromatina que se corresponde con una alteración de la memoria a largo plazo que puede ser revertida con inhibidores de las HAT (59, 60). Además, la sobreexpresión de una proteína CREB constitutivamente activa o el tratamiento con rolipram, un inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc que incrementa la fosforilación de CREB, también rescatan parcialmente el fenotipo observado en estos animales (59, 61). Un mecanismo adicional de regulación implicaría la fosforilación del dominio de unión/dimerización al ADN (bZIP) de CREB, que parece contribuir significativamente a la activación de CREB en respuesta a un aumento del calcio intracelular mediando la interacción de CREB con proteínas coactivadoras (62).

En la búsqueda de posibles candidatos para la interacción con CREB se ha identificado una familia de moléculas coactivadoras altamente conservadas denominadas TORCs, Estas proteínas median la activación de CREB dependiente de calcio y de AMPc, independientemente del estado de fosforilación de CREB. La familia TORC está constituida por tres miembros que comparten un dominio «coiled-coil» o de doble espiral en el extremo amino terminal y que se asocian formando tetrámeros con el dominio bZIP de CREB. Los dominios de doble espiral proporcionan una gran estabilidad a la estructura de α-hélice, siendo característicos de las proteínas sometidas a un elevado estrés estructural como la tropomiosina, las queratinas y la laminina. Los niveles de expresión de las TORCs son muy bajos en las células, al contrario de lo que sucede con CBP. En condiciones basales, estas proteínas tienen una localización preferentemente citosólica, pero tras una estimulación se movilizan al núcleo donde ejercen su efecto regulador sobre CREB. Un claro ejemplo lo encontramos en las células de los islotes pancreáticos donde, en condiciones de reposo, TORC2 se encuentra secuestrado en el citoplasma mediante su fosforilación y consecuente interacción con las proteínas 14-3-3. Tras una estimulación hormonal o un aumento de glucosa, se produce un aumento de calcio y la consecuente activación de la calcineurina que desfosforila TORC2, liberándolo de su unión a las proteínas 14-3-3 y permitiendo su translocación al núcleo donde regula la transcripción dependiente de CREB. Por otro lado, un aumento en los niveles intracelulares de AMPc se asocia con la inhibición de la quinasa SIK2, reduciéndose también la fosforilación de TORC2 (63, 64). A nivel nuclear, las TORCs promueven la transcripción mediada por CRE a través de su interacción con el dominio bZIP de CREB. El reclutamiento de TORC es independiente de la fosforilación de bZIP y no parece regular la capacidad de unión de CREB al ADN, sino que incrementa la interacción entre el dominio de transactivación rico en glutaminas de CREB y la proteína TAFII130, un componente del complejo TFIID (54, 65).

Finalmente, la interacción calcio-dependiente de CREB o fosfoCREB con el represor transcripcional DREAM (modulador antagonista de los elementos de respuesta «downstream» (DREAM) regula la accesibilidad de CBP al dominio inducible por quinasa (KID) de CREB, reduciendo así la transcripción mediada por CREB (66). Este mecanismo, que se describe detalladamente en el apartado 2D, constituye junto con el de TORCs, una vía de regulación de la actividad de CREB independiente de su estado de fosforilación.

B. MEF-2

MEF-2 es una familia de factores de transcripción miogénicos constituida por cuatro miembros (MEF-2A, B, C y D) que desempeñan un papel determinante en la diferenciación de los miocitos y en la activación de los linfocitos T mediante la regulación transcripcional de genes específicos (67, 68). De hecho, la pérdida de MEF-2C es letal en estadíos embrionarios tempranos como consecuencia de la aparición de anomalías cardiacas severas durante el desarrollo (69). Asimismo, MEF-2A y MEF-2C se encuentran altamente expresados en neuronas postmitóticas del cerebelo y de la corteza cerebral, respectivamente, donde ejercen un papel fundamental en la supervivencia neuronal (70). La actividad transcripcional de las proteínas MEF-2 se encuentran reguladas por una gran variedad de mecanismos. En condiciones de reposo, las proteínas MEF-2 se encuentran unidas al ADN como parte de un complejo represor que incluye HDACs y proteínas de unión a calmodulina entre otras (71). Las proteínas HDAC4 y HDAC5 interaccionan con un dominio denominado MEF-2 que se localiza en las proximidades de la caja MADS en el extremo amino terminal de las proteínas MEF-2, reprimiendo la actividad transcripcional de MEF-2 sobre sus genes diana, como por ejemplo c-jun (71-73). Normalmente, MEF-2B y MEF-2D son secuestradas por cabin1 o por el represor transcripcional de interacción con MEF-2 (MITR) formando complejos multiproteicos junto a HDAC1 (74, 75). Cabin1 recluta tanto histona desacetilasas como histona metiltransferasas para reprimir la actividad transcripcional de MEF-2 (76, 77). Como consecuencia, la transcripción de los genes diana, como nur77, también se encuentra reprimida (78). HDAC4, cabin1 v MITR interaccionan con la Ca²⁺/calmodulina y con MEF-2 a través del mismo dominio, de forma que tras una estimulación y la consecuente formación de complejos Ca²⁺/calmodulina nucleares, las proteínas MEF-2 quedan libres del complejo represor (78, 79). Este mecanismo Ca²⁺-dependiente se encuentra parcialmente contrarrestado en el caso de MEF-2D por un aumento en los niveles de AMPc (80), Además, la fosforilación dependiente de calcio del dominio MEF-2 por la CaMKI y la CaMKIV impide la interacción con HDAC, liberando MEF-2 de su represión (71, 74). Ambas quinasas fosforilan a HDAC4 y HDAC5 creando un fosfodominio que se une a las proteínas 14-3-3 y media la exportación de las HDACs del núcleo al citosol, liberando de su represión a MEF-2 (81, 82). Cabe destacar que en miocitos, donde HDAC9 reprime la actividad transcripcional de MEF-2, se ha descrito un ciclo de retroalimentación negativa en el que HDAC9 es a su vez una diana transcripcional directa de MEF-2 (83).

La activación de las proteínas MEF-2 es un evento dependiente de calcio para el que se han propuesto dos mecanismos principales. En primer lugar, el grupo de Greenberg ha demostrado que en neuronas de cerebelo la entrada de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) induce la activación de MKK6-p38 MAPK, produciéndose la fosforilación de la Ser-387 localizada en el dominio de transactivación de MEF-2C (84). En segundo lugar, se ha propuesto que la calcineurina activa MEF-2 mediante un mecanismo posttranscripcional que en neuronas granulares de cerebelo incrementa su actividad de unión al ADN (85). En ambas hipótesis se previene la formación de los complejos MEF-2/HDAC, se induce la exportación nuclear de las HDACs de clase II, se activa la transcripción dependiente de MEF-2 y, dependiendo del tipo celular, se estimula la expresión de citoquinas, la miogénesis o la supervivencia neuronal (Figura 4).

C. NFAT

La familia de factores de transcripción denominada NFAT está constituida por 5 miembros: NFATc1, NFATc2, NFATc3, NFATc4 y NFATc5 (también denominado TonEBP), todos ellos evolutivamente relacionados con la también familia de factores de transcripción Rel/NF-κB. Además de su importante papel en la respuesta inmune, las proteínas NFAT también se encuentran implicadas en el desarrollo del corazón, músculo esquelético y sistema nervioso. La des-

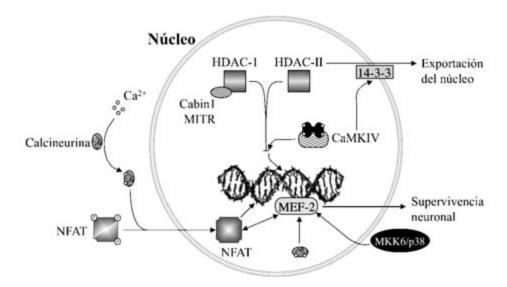


FIGURA 4. Regulación calcio dependiente de la expresión génica mediada por MEF-2. La actividad de MEF-2 se encuentra modulada por acción de la calcineurina y algunas MAP quinasas (MKK6/p38) así como por la formación de complejos nucleares con las histona desacetilasas (HDACs).

fosforilación de una región rica en serinas (SRR) presente en el extremo amino terminal de NFAT por acción de la calcineurina produce un cambio conformacional en la proteína que expone una señal de localización nuclear, permitiendo su translocación al núcleo. Una vez allí, NFAT se une al ADN de forma individual o formando parte de complejos con otras nucleoproteínas como Fos-Jun para activar la transcripción de genes específicos dependiendo del tipo celular en el que se encuentre (86, 87). El proceso finaliza con la fosforilación de NFAT por la caseína quinasa I (CK1) o por la acción secuencial de las quinasas constitutivas PKA y GSK-3, induciendo la exportación de NFAT fosforilado al citosol (Figura 5) (88, 89). El proceso completo es extremadamente rápido, lo que proporciona a las proteínas NFAT una sensibilidad adicional a la hora de detectar cambios en la dinámica intracelular de los niveles de Ca²⁺ (3). Existen quinasas inducibles como MAPKs p38 y JNK que confieren una especificidad adicional por presentar diferentes afinidades por los distintos miembros de la familia NFAT (90, 91). Por otro lado, las quinasas reguladas por fosforilación en tirosina de doble especificidad (DYRK) 1A y 2 son moduladores negativos de la activación de NFAT. DYRK1A se localiza en el núcleo donde ejerce un primer evento de fosforilación que bloquea la fosforilación de NFAT por CK1 y

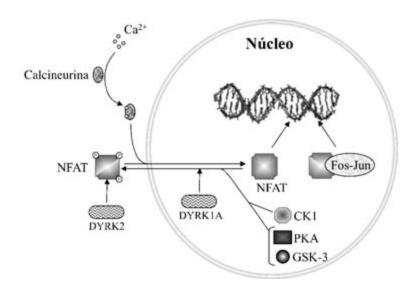


Figura 5. Regulación calcio dependiente de la expresión génica mediada por NFAT. La localización subcelular y la actividad de NFAT se encuentran reguladas por un mecanismo de fosforilación/defosforilación que implica a la calcineurina y a las quinasas GSK-3, PKA y CK1. Adicionalmente, las quinasas DIRK actúan como moduladores negativos de la actividad de NFAT

GSK-3, produciendo la inactivación de NFAT (92, 93). DYRK2, que se encuentra en el citosol, actúa como una quinasa constitutiva que mantiene el nivel de fosforilación de NFAT en las células en reposo (93). NFAT puede actuar como activador o represor de la expresión génica dependiendo de los complejos nucleoproteicos de los que forma parte: una activación génica implica la acción coordinada de NFAT y AP-1, mientras que en ausencia de AP-1, NFAT recluta correpresores que silencian la expresión de los genes diana (94). Recientemente se ha descrito que NFAT reprime la expresión de CDK4 mediante el reclutamiento de histona desacetilasas a la región 3' previa al sitio de inicio de la transcripción del gen (95).

En la mayoría de los casos, la ablación génica de un sólo miembro de la familia NFAT produce fenotipos parciales, lo que sugiere la existencia de un cierto grado de redundancia en las funciones de las distintas proteínas de la familia. Los fenotipos más destacados únicamente se observan en el caso de eliminar dos o más proteínas NFAT. Por ejemplo, la deleción de NFATc3 y NFATc4 provoca graves defectos en las proyecciones de las neuronas sensoriales que resultan letales durante el desarrollo embrionario (96, 97). Como era de esperar, la deleción de tres miembros de la familia, NFATc2, -c3 y -c4, produce efectos

muy graves en la arborización axonal del sistema nervioso central y periférico. Así, aunque las neuronas procedentes de estos triples ratones deficientes pueden sobrevivir en cultivo, son incapaces de desarrollar prolongaciones en respuesta a factores de crecimiento como las neurotrofinas o la netrina-1 (98). Estos resultados coinciden con el comportamiento sensorial aberrante observado en *Caenorhabditis elegans* que presentan una pérdida de función en TAX-6, la subunidad catalítica de la calcineurina (99).

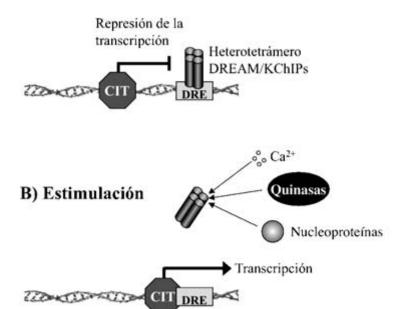
D. DREAM

En el apartado 2A, DREAM se ha definido como una proteína de interacción con CREB que, al regular la accesibilidad de CBP al dominio KID de CREB, reprime la transcripción dependiente de los sitios CRE. Sin embargo, las funciones de DREAM en el control de la expresión génica dependiente de calcio son mucho más extensas. DREAM, también denominado KChIP-3 o calsenilina, es una proteína multifuncional que forma parte de la subfamilia de proteínas sensoras de calcio KChIP (proteína de interacción con canales de potasio) (100-102). Esta familia esta formada por cuatro miembros (KChIP-1 a -4) que se encuentran estructural y funcionalmente relacionados entre sí (103). Los KChIPs se coexpresan en múltiples áreas cerebrales diferentes y también en tejidos no neurales como el sistema inmune, la glándula tiroidea y los órganos reproductores. Además, dependiendo del tipo celular y de las condiciones fisiológicas concretas, DREAM puede presentar diferentes localizaciones subcelulares incluyendo las proximidades de la membrana plasmática, el citosol y el núcleo. Todos los KChIPs comparten la característica de unirse como homo- o heterotetrámeros a secuencias específicas en el ADN denominados sitos DRE, reprimiendo así la transcripción de los genes diana (102-105). Los KChIPs contienen en su secuencia cuatro motivos de manos-EF, tres de los cuales son funcionales. El término mano-EF describe a dos secuencias de α -hélice que se orientan perpendicularmente entre ellas y están conectadas por un lazo que contiene residuos aminoacídicos con alta afinidad por el Ca²⁺. La unión del Ca²⁺ a las manos-EF induce un cambio conformacional en las proteínas KChIPs, modificando su funcionalidad de manera calcio-dependiente. Así, un aumento en la concentración de Ca²⁺ intranuclear induce la liberación de los tetrámeros de los sitios DRE y, en consecuencia, la desrepresión de los genes diana. La mutación de cualquiera de las manos-EF funcionales produce una proteína DRE-AM mutada (EFmDREAM) insensible a calcio que permanece unida a los sitios DRE de manera constitutiva, es decir, reprime de forma permanente la

expresión génica (102). Dado que los KChiPs deben formar parte de tetrámeros para actuar como represores transcripcionales, las proteínas mutadas funcionan como dominantes activos de las proteínas nativas cuando heteromerizan entre sí (106). La represión génica dependiente de DREAM también se encuentra regulada por fosforilación tras la activación de las quinasas PKA o PI3K, así como por un aumento en los niveles de AMPc (107, 108). En el último caso, la desrepresión se debe a una interacción proteína-proteína entre DREAM y α- o ε-CREM, dos efectores nucleares que median las acciones transcripcionales del AMPc (107). Dicha interacción se produce a través de dos dominios ricos en leucinas y aminoácidos cargados (LCDs) que están presentes tanto en la molécula de DREAM como en α-/ε-CREM. Los motivos LCD se caracterizaron por primera vez en algunas proteínas nucleares coactivadoras (NCoA-1, p/CIP) y correpresoras (NCoR, SMRT) y han sido implicados en las interacciones proteína-proteína con los receptores de hormonas nucleares y con CBP (109-111). Del mismo modo, la presencia de dominios LCD en la proteína DREAM hace posible su interacción con otras nucleoproteínas de forma que se pueden modular diferentes eventos transcripcionales no relacionados directamente con la presencia de sitios DRE en las regiones promotoras. De hecho, DREAM puede interaccionar con CREB de forma LCD-dependiente desplazando a CREB de los sitios CRE en el genoma y evitando el reclutamiento de CBP por fosfo-CREB. Así, DREAM puede reprimir la expresión génica mediada por CREB sin unirse directamente a los sitios CRE o DRE (66). La interacción DREAM-CREB es dependiente de calcio y los mutantes EFmDREAM también se comportan como dominantes activos sobre la transcripción calcio-dependiente mediada por CREB (66). Además, se han descrito interacciones independientes de Ca²⁺ y de LCD entre DREAM y otras nucleoproteínas que demuestran la gran versatilidad de esta proteína en la regulación de la expresión génica (112, 113). En la Figura 6 se resumen los mecanismos de regulación de DREAM como represor transcripcional.

Hasta la fecha, los KChIPs constituyen la única familia de sensores de calcio con manos-EF capaz de unirse específicamente al ADN y de regular directamente la transcripción de manera Ca²+-dependiente. Recientemente se ha caracterizado una nueva proteína denominada Freud-1 que se une a sitios específicos FRE presentes en la región promotora proximal del gen del receptor de serotonina 1A y reprime su expresión basal de manera Ca²+-dependiente (114). Freud-1 es una proteína evolutivamente conservada que contiene dos repeticiones básicas DM-14, una región de dos α-hélices conectadas por un lazo β predicho como el dominio de unión al ADN y una región C2 de unión a calcio/fosfolípidos similar a las encontradas en las PKC

A) Condiciones basales



C) Condiciones basales o de estimulación

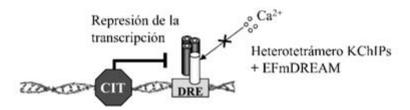


FIGURA 6. Regulación de la represión transcripcional mediada por DREAM/KChIPs. A) En condiciones basales, DREAM se une como homo o heterotetrámero a los elementos DRE localizados en la región promotora proximal de los genes diana, reprimiendo su transcripción. B) En condiciones de estimulación, un aumento en la concentración de Ca²+ intranuclear, la fosforilación de DREAM y/o la interacción de DREAM con otras nucleoproteínas como αCREM, median la liberación de los tetrámeros de los sitios DRE, produciéndose la desrepresión de los genes diana. C) La proteína DREAM mutada insensible a calcio (EFmDREAM) es un dominante activo que permanece unido a los sitios DRE de manera constitutiva, independientemente de los niveles de calcio intranucleares.

convencionales. Se requiere la presencia del dominio C2 intacto para que se produzca la desrepresión mediada por Ca²⁺ y el tratamiento con inhibidores de la calmodulina o de las CaMKs revierte dicha desrepresión, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación adicional dependiente de fosforilaciones.

La represión transcripcional mediada por DREAM se caracterizó por primera en el gen de la prodinorfina, que presenta sendos sitios DRE en su región promotora proximal (102, 115). Curiosamente, la ablación génica del sensor de calcio neuronal-1, un gen funcionalmente relacionado con el de la prodinorfina, en C. elegans produce defectos en el aprendizaje y la memoria asociativa del gusano (116). Los ratones deficientes de DREAM presentan alteraciones en la respuesta al tratamiento crónico con cannabinoides y un aumento en la expresión de la prodinorfina en la médula espinal de estos animales, observándose un fenotipo hiperalgésico que demuestra la implicación de DREAM en el proceso nociceptivo (117). Sin embargo, exceptuando los fenómenos mencionados anteriormente, la falta de expresión de DREAM no produce ninguna otra alteración fenotípica marcada, lo que apuntaría a la existencia de una redundancia funcional entre los distintos miembros de la familia KChIP. Para abordar este problema y poder dilucidar la importancia fisiológica de este grupo de proteínas, se han generado ratones transgénicos que sobreexpresan la forma mutada EFmDREAM insensible a la regulación por calcio y dominante activo sobre los KChIPs nativos. En el cerebelo de estos animales se observa una disminución significativa en la expresión del intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ de membrana tipo 3 (NCX3), una proteína fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de calcio de las neuronas granulares de cerebelo (CGN) (106). Además, en cultivos primarios de CGN transgénicas, la reducción en los niveles de NCX3 tuvo como consecuencia un aumento en los niveles citosólicos de Ca2+ libre y consecuentemente una elevada vulnerabilidad al cultivo en condiciones despolarizantes (106).

E. NFkB/IkB

NFκB es un heterodímero de p65 (RelA) con p50 ó p52 que se expresa en casi todos los tipos celulares y que está implicado en la regulación de un gran número de genes que median la respuesta inmune, inflamatoria y de estrés (118, 119). NFκB se encuentra anclado a un grupo de proteínas denominadas IκB, que lo mantienen retenido en el citosol mediante la ocultación de su señal de localización nuclear (120). La hiperfosforilación de IκB en los residuos Ser-32

y Ser-36 por las quinasas IKK α y IKK β la hacen susceptible de ser ubiquitinada y posteriormente degradada por el complejo del proteasoma (121, 122). De este modo, NF κ B queda libre y se transloca al núcleo donde ejerce su función transcripcional. Además, estudios recientes realizados tanto en neuronas como en linfocitos T demuestran que la CaMKII es un activador de NF κ B (123). En neuronas en condiciones de reposo la forma p65:p50 de NF κ B se localiza preferentemente a nivel sináptico pero, tras una despolarización, los niveles de NF κ B nucleares aumentan significativamente (124). Este fenómeno es bloqueado por antagonistas de los receptores de glutamato y por inhibidores de la transmisión sináptica y de los CCDV. Cabe destacar que en ratones carentes de p65 se han observado anomalías en la memoria y el aprendizaje no relacionados con alteraciones motoras, de percepción o de motivación.

F. Nuevos efectores transcripcionales regulados por calcio

Recientemente se ha caracterizado una proteína denominada CREST (transactivador de respuesta a calcio) capaz de inducir la expresión de genes de manera dependiente de calcio. Por el momento se desconoce el mecanismo por el cual las señales de calcio median la activación de CREST, ya que esta proteína carece de dominios de unión a Ca²⁺ (125, 5). Además, CREST no se une directamente al ADN, por lo que debe asociarse con otras nucleoproteínas para activar la transcripción. Por ejemplo, es capaz de interaccionar con CBP a través los últimos nueve aminoácidos de su extremo carboxilo terminal, mecanismo que explicaría el fenómeno de maduración dendrítica inducido por CREST y que se encuentra asociado a la fosforilación de CREB inducida por un aumento de Ca²⁺/AMPc tras la estimulación neuronal (126). En las neuronas piramidales corticales de ratones deficientes de CREST se observa una disminución en el crecimiento y la arborización de las dendritas basales (las más próximas al soma) (125). El 80% de estos ratones mueren durante la segunda o tercera semana de vida postnatal, indicando que este factor debe desempeñar una función biológica esencial. Desgraciadamente, no se conocen los genes diana de CREST que se encuentran directamente implicados en la regulación del desarrollo dendrítico. Esta proteína presenta cerca de su extremo C-terminal un dominio multifuncional que contiene una señal de localización nuclear y que está implicado en la dimerización de CREST, requerida para que esta proteína sea transcripcionalmente activa (127).

Los CCDVs también pueden estar involucrados directamente en la regulación transcripcional de genes específicos. Estudios previos han descrito que la ruptura del extremo C-terminal de los CCDVs genera fragmentos que están implicados en la regulación de la actividad del propio canal reduciendo el flujo de entrada de Ca²⁺ (128). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el fragmento C-terminal procedente de la subunidad Ca. 1.2 del CCDV tipo L, denominado regulador transcripcional asociado a un canal de calcio (CCAT), se localiza en el núcleo de interneuronas GABAérgicas inhibitorias cortico-hipocampales donde regula la expresión de genes concretos (129, 130). Se desconoce si este tipo de modulación transcripcional se produce en otros tipos celulares no neuronales que también presentan canales de tipo L. La expresión génica regulada por CCAT es dependiente de la estimulación neuronal ya que, en respuesta a una despolarización, se produce un aumento en los niveles de calcio que inducen la exportación de los fragmentos CCAT desde el núcleo al citosol (129). Además, dicha regulación transcripcional requiere la interacción de CCAT con otras nucleoproteínas como p54 (nrb)/NonO, una proteína nuclear de 54 kDa de unión al ADN y ARN, también denominada proteína de unión a octámero conteniendo dominio Non-POU (131). Dado que otras subunidades Ca, sufren la ruptura en su extremo carboxilo (132-134), es posible que el mecanismo de control transcripcional anteriormente descrito no sea exclusivo de la subunidad Ca.1.2. De hecho, se ha descrio que la subunidad Ca, 2.1 genera un fragmento COOHterminal que se localiza en el núcleo de las neuronas de Purkinje (135).

3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA DEPENDIENTES DE CALCIO

Los sensores de Ca²⁺ como DREAM, calmodulina, S-100 y calreticulina, son proteínas multifuncionales que interaccionan de manera calcio-dependiente con diferentes dianas nucleares como factores de transcripción o enzimas. En este apartado se mencionarán dos tipos de interacciones que por su importancia merece la pena destacar: por un lado la interacción de los sensores de Ca²⁺ con las superfamilias de factores de transcripción bHLH, las proteínas Sox y los receptores nucleares, y por otro lado los cambios en la estructura de la cromatina regulados por calcio.

A. Sensores de Ca²⁺ nucleares

La calmodulina, una pequeña proteína acídica de 148 aminoácidos, es el prototipo de los sensores de calcio (139). Contiene cuatro manos-EF de unión a Ca²⁺ que se distribuyen en parejas dentro de dos regiones globulares simétricas que se localizan en los extremos NH₂ y COOH terminales de la proteína. Ambas regiones se encuentran unidas por una hélice central flexible que com-

pleta la típica estructura en forma de mancuerna (140). Las proteínas S-100 también poseen dominios de unión a Ca²⁺ del tipo manos-EF y pueden interaccionar con múltiples dianas, muchas de ellas compartidas con la CaM. Tanto las proteínas S-100 como la CaM establecen interacciones electrostáticas con los dominios básicos de unión al ADN presentes en los factores de transcripción bHLH de clase I (136, 141). Esta interacción bloquea la unión de dichos factores al ADN, produciendo la pérdida de su actividad transcripcional. Además, la interacción de S-100 y CaM con las proteínas bHLH evita que éstas sufran modificaciones post-transcripcionales que están implicadas en su capacidad de transactivación (142) o en su interacción con algunos componentes de la maquinaria transcripcional como HATs, HDACs o proteínas nucleares como pRB, Notch y Mos (143). Las proteínas bHLH constituyen una familia de nucleoproteínas que se expresan ampliamente en diferentes órganos y que se encuentran involucradas en el control del crecimiento y diferenciación celular (144), jugando un papel importante en la neurogénesis, hematopoyesis y miogénesis. En un modelo murino que carece de la proteína Neuro2D, una proteína sensible a Ca²⁺ de la familia bHLH, se observa una falta de maduración sináptica y un patrón alterado en la proyecciones tálamo-corticales (145).

La CaM también puede regular la importación nuclear de importantes factores de transcripción, como es el caso de las proteínas Sox (caja HMG relacionada con Sry). Estas proteínas constituyen una gran familia factores de transcripción que activan la expresión de genes mediante su unión a regiones específicas en el ADN denominadas cajas HMG y mediante su interacción como proteínas coactivadoras (146). La proteína Sox9 es un miembro de la familia Sox que se expresa de forma temprana en el embrión regulando la condrogénesis, la formación del testículo y el desarrollo de la cresta neural (146). La unión de la Ca²⁺-CaM con el dominio HMG de Sox9 bloquea su importación a núcleo y, en consecuencia, su actividad transcripcional (147). La presencia de mutaciones sin sentido en el dominio HMG de Sox9 que afectan a su interacción con la CaM, produce un síndrome autonómico dominante de malformaciones óseas severas denominado displasia campomélica (147). Este síndrome se caracteriza por el encorvamiento de los fémures y tibias, junto con otras alteraciones orofaciales, cardiopulmonares y neurológicas, en el que la mayoría de los individuos XY presentan una reversión sexual de macho a hembra.

Finalmente, la calreticulina es otra proteína sensora de Ca²⁺ que, aunque inicialmente se localiza predominante en el interior del retículo endoplásmico, puede interaccionar con el dominio de unión al ADN múltiples nucleoproteínas como los receptores de glucocorticoides, andrógenos, ácido retinoico y vitami-

na D, bloqueando sus actividades transcripcionales (137, 138). Además, la calreticulina media de manera calcio-dependiente la exportación nuclear de los receptores de glucocorticoides (148, 149). La deleción de una secuencia señal en el extremo amino-terminal de la calreticulina elimina su efecto sobre la capacidad de transactivación de los receptores de glucocorticoides (150), pero no afecta su función como factor de exportación nuclear (151).

B. Modificaciones Ca²⁺-dependientes en la estructura de la cromatina

Las enzimas reguladas por Ca²⁺ no sólo modifican la actividad de determinadas vías transcripcionales sino que también actúan sobre proteínas que se asocian a la cromatina, como las histonas o el grupo de proteínas de alta movilidad (HMG), alterando selectivamente el entorno nucleosomal y provocando que determinados genes específicos expongan o enmascaren sus regiones reguladoras de manera calcio-dependiente. Un claro ejemplo es la correlación existente entre la inducción de la expresión del gen *c-fos* y el aumento de su sensibilidad a la enzima DNAsaI (152), fenómeno que se relaciona con la fosforilación de la histona H3 y de las proteínas HMG (153).

Las histonas son proteínas básicas, de baja masa molecular, muy conservadas evolutivamente entre los eucariotas y en algunos procariotas. Constituyen los componentes esenciales junto con el ADN de la cromatina sobre la base de unas unidades conocidas como nucleosomas. Las cuatro histonas centrales o «core» forman un octámero alrededor del cual se enrolla el ADN, en una longitud variable en función del organismo. Este octámero se ensambla a partir de un tetrámero de las histonas llamadas H3 y H4, al que se agregan dos heterodímeros de las histonas denominadas H2A y H2B. Las histonas pueden ser modificadas covalente y post-traduccionalmente, en general en sus extremos amino-terminales, mediante reacciones catalizadas por una serie de actividades enzimáticas, incluyendo acetilaciones, fosforilaciones, metilaciones, y ADP-ribosilaciones. Estas modificaciones pueden tener consecuencias en cuanto a la estructura de la cromatina y la facilidad con la que las nucleoproteínas pueden acceder al ADN. Las proteínas HMG son proteínas cromosómicas no histónicas de bajo peso molecular que presentan un alto contenido en aminoácidos básicos y en aminoácidos ácidos, una elevada proporción de prolina, un bajo contenido en aminoácidos hidrofóbicos y una alta movilidad electroforética. Se han detectado más de 20 proteínas HMG, habiéndose encontrado las proteínas HMG-1, HMG-2, HMG-14 y HMG-17 en todas las especies de mamíferos, aves y peces estudiadas hasta el momento. Ejercen un papel fundamental en la estabilización del enhanceosoma (complejo proteico que se une a la región promotora de un gen para activar su expresión) y en la elongación de la transcripción (154).

Como se ha comentado previamente, las proteínas que se asocian a la cromatina pueden sufrir modificaciones post-traduccionales entre las cuales la fosforilación y la acetilación/desacetilación son las mejor caracterizadas en términos de control de la estructura de la cromatina dependientes de la actividad celular. En los años ochenta, el grupo de Schulman demostró que la histona H3 y la proteína HMG-17 son fosforiladas específicamente en respuesta a un incremento en la concentración extracelular de Ca²⁺ (155). Además, tras la fosforilación de estas proteínas se produce la hiperacetilación de los extremos NH₂terminales de las histonas y se reduce la metilación de estos mismos residuos (156, 157). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual la fosforilación de las proteínas asociadas a la cromatina facilita la transcripción, se ha propuesto que la fosforilación de las histonas impide el acceso de los correpresores transcripcionales asociados a las HDACs y de las ADN metiltransferasas, estabilizando una conformación abierta de la proteína. Un aspecto importante consiste en averiguar cuáles son las quinasas que median dicha fosforilación. En un primer lugar, la fosforilación dependiente de Ca²⁺/CaM de la histona H3 sugirió la implicación de una CaMK nuclear (158). Estudios más recientes apuntan a las quinasas activadas por estrés y mitógenos (MSK1 y 2), proteínas efectoras que se activan con posterioridad a ERK y p38, como responsables de la fosforilación de la H3 y la HMG-14 que se asocia a la inducción de los genes inmediatos-tempranos c-fos/c-jun (159, 160). Las MSKs también son responsables de la activación directa de la subunidad p65 de NF-κB y de CREB (161, 162). Este proceso de inducción transcripcional es revertido por acción de la PP1, que ha sido implicada en la defosforilación de la H3 (163).

La relevancia fisiológica de la fosforilación de las histonas y las proteínas HMG se hace patente en dos estudios recientes que muestran *in vivo* cómo un pulso de luz durante el ciclo nocturno induce la fosforilación de la H3 dependiente de MSK1 en neuronas hipotalámicas del núcleo supraquiasmático, el principal regulador del ritmo circadiano (164, 165). El efecto de la luz es específico y la cinética de fosforilación de la H3 es paralela a la inducción de los genes c-fos y mPer1 (el ortólogo murino del gen period en Drosophila) en la misma neurona. Además, la inhibición de los receptores de GABA_B bloquea tanto la fosforilación de la H3 como la expresión de c-fos y mPer1 (165). En concordancia con estos resultados, estudios previos habían demostrado que tanto los niveles de fosfoCREB como la expresión génica dependiente de CRE oscilan

siguiendo un ritmo circadiano en las células del núcleo supraquiasmático, y que un pulso de luz durante el ciclo nocturno induce un incremento en la expresión génica mediada por CRE en estas células (166).

La acetilación/desacetilación es la modificación post-traduccional mejor caracterizada en el caso de las histonas. Normalmente la acetilación se relaciona con una activación de la expresión mientras que la desacetilación se asocia con una represión transcripcional. Es un hecho comúnmente aceptado que la acetilación neutraliza parcialmente la carga positiva de las histonas, reduciendo su afinidad por el ADN. De este modo, se crea una conformación abierta de la histona que permite el acceso de otras proteínas al ADN. La desacetilación de la histona produce el efecto contrario. Los mecanismos que modifican la actividad de las histona desacetilasas de manera actividad-dependiente incluyen: interacciones proteína-proteína, cambios en la localización subcelular del enzima, modificaciones post-traduccionales y regulación de su disponibilidad controlando la expresión de las HDACs o su procesamiento proteolítico. En los mamíferos, las HDACs se clasifican en tres grupos diferentes (I, II y III) dependiendo de su homología de secuencia con las HDACs de levadura: Rpd3 (proteína de dependencia del potasio reducida 3), Hda1 (histona desacetilasa 1) y Sir2 (regulador de información silente 2), respectivamente. En general, las HDACs no interaccionan directamente con al ADN, sino que dependen de otras nucleoproteínas para su reclutamiento en localizaciones específicas del genoma. Las HDACs se encuentran normalmente unidas a proteínas de andamiaje como Sin3 formando parte de grandes complejos multiproteicos multifuncionales que regulan la actividad de las propias HDACs (167). Por ejemplo, se ha descrito un aumento en la actividad de la HDAC3 tras su interacción con el complejo silenciador SMRT/N-CoR (168, 169). El mecanismo de activación de la HDAC3 conlleva el desplazamiento de la proteína inhibidora TriC (complejo en anillo TCP-1) que se encuentra unida a HDAC3 bloqueando su actividad enzimática (170). La fosforilación es otro de los principales mecanismos de regulación de las HDACs. Las acetilasas de clase I aumentan su actividad tras ser fosforiladas por la caseína quinasa II y/o la PKA, a excepción de la HDAC8, cuya actividad se ve reducida al ser fosforilada por PKA (171, 172, 173). En las HDACs de clase II, la fosforilación modifica su localización subcelular y su habilidad para interaccionar con otras proteínas. Así, la fosforilación Ca²⁺-dependiente de HDAC4 y HDAC5 por la CaMKIV bloquea su interacción MEF-2 (78, 79). La desfosforilación de las HDACs también es un proceso sensible a calcio, ya que la mayoría de estas enzimas forman complejos que incluyen la fosfatasa PP1 (50).

4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En los últimos años se han caracterizado un número ingente de proteínas sensibles a calcio así como nuevas vías de señalización dependientes de este ión que esclarecen considerablemente la comprensión de los mecanismos que regulan la expresión génica. Estos descubrimientos también han hecho surgir nuevas cuestiones sobre los mecanismos que restringen espacial y temporalmente la actividad transcripcional de una región genómica concreta, definiendo así un patrón de expresión adecuado en cada momento y circunstancia. En el futuro será de vital importancia conocer el orden jerárquico de las distintas vías de señalización reguladas por Ca²⁺ que operan simultáneamente en el control de la expresión de un gen concreto.

Las últimas investigaciones se han centrado fundamentalmente en el estudio de la naturaleza y las características de la señal de calcio, sin clarificar demasiado cómo las diferentes reservas y localizaciones de Ca²⁺ libre activan o reprimen de manera diferencial una vía transcripcional dada. Probablemente existen numerosos mecanismos de regulación desconocidos por el momento que participan en la modulación de la respuesta transcripcional, así como de las características temporales de dicha respuesta.

Finalmente mencionar que algunas publicaciones recientes han destacado la existencia de una reserva nuclear de fosfoinositidos que parecen participar en la regulación de la expresión génica (174, 175, 176). Además, existen nuevas evidencias que apuntan la existencia de una reserva nuclear de calcio regulado de forma similar (10), aunque se necesita progresar en la investigación para cerciorarse de que dicha reserva de calcio es realmente nuclear e independiente del retículo endoplásmico. Tampoco se conocen los mecanismos que regulan la liberación del Ca²⁺ nuclear o que controlan el paso de estos iones a través de los poros nucleares. Otra cuestión abierta se refiere a la posible existencia de un «diálogo» entre las reservas nucleares de inositoles fosfato y calcio que pudiera remodelar la cromatina o influenciar directamente las vías transcripcionales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) DOLMETSCH, R.E.; Xu, K. Y LEWIS, R.S. (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. 392: 933-936.
- (2) Li, W.; Llopis, J.; Whitney, M.; Zlokarnik, G. y Tsien, R.Y. (1998) Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca2+ spike frequency can optimize gene expression. *Nature*. 392: 936-941.

- (3) DOLMETSCH, R.E.; LEWIS, R.S.; GOODNOW, C.C. Y HEALY, J.I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca2+ response amplitude and duration. *Nature*. 386: 855-858.
- (4) Hardingham, G.E.; Chawla, S.; Johnson, C.M. y Bading, H. (1997) Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*. 385: 260-265.
- (5) HARDINGHAM, G.E.; FUKUNAGA, Y. Y BADING, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat. Neurosci.* 5: 405-414.
- (6) PAPADIA, S.; STEVENSON, P.; HARDINGHAM, N.R.; BADING, H. Y HARDINGHAM, G.E. (2005) Nuclear Ca2+ and the camp response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J. Neurosci.* 25: 4279-4287.
- (7) DIVECHA, N.; RHEE, S.G.; LETCHER, A.J. Y IRVINE, R.F. (1993) Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: Phosphoinositidase C isoform beta 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Biochem. J.* 289: 617-620.
- (8) Lui, P.P.; Kong, S.K.; Kwok, T.T. y Lee, C.Y. (1998) The nucleus of Hela cell contains tubular structures for Ca2+ signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 88-93.
- (9) SANTELLA, L. Y CARAFOLI, E. (1997) Calcium signaling in the cell nucleus. *Faseb J.* 11: 1091-1109.
- (10) ECHEVARRIA, W.; LEITE, M.F.; GUERRA, M.T.; ZIPFEL, W.R. Y NATHANSON, M.H. (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 5: 440-446.
- (11) Hudmon, A. y Schulman, H. (2002) Structure-function of the multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J.* 364: 593-611.
- (12) Hook, S.S. y Means, A.R. (2001) Ca2+/CaM-dependent kinases: From activation to function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41: 471-505.
- (13) Griffith, L.C. (2004) Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions. *J. Neurosci.* 24: 8394-8398.
- (14) SILVA, A.J.; STEVENS, C.F.; TONEGAWA, S. Y WANG, Y. (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 257: 201-206.
- (15) GORDON, J.A.; CIOFFI, D.; SILVA, A.J. Y STRYKER, M.P. (1996) Deficient plasticity in the primary visual cortex of alpha-calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mutant mice. *Neuron.* 17: 491-499.

- (16) Chen, C.; Rainnie, D.G.; Greene, R.W. y Tonegawa, S. (1994) Abnormal fear response and aggressive behavior in mutant mice deficient for alpha-calcium-calmodulin kinase II. *Science*. 266: 291-294.
- (17) WAXHAM, M.N.; GROTTA, J.C.; SILVA, A.J.; STRONG, R. Y ARONOWSKI, J. (1996) Ischemia-induced neuronal damage: A role for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 16: 1-6.
- (18) Redig, A.J. Y Platanias, L.C. (2007) The protein kinase C (PKC) family of proteins in cytokine signaling in hematopoiesis. *J. Interferon Cytokine Res.* 27: 623-636.
- (19) HARHAJ, E.W. Y Sun, S.C. (1998) IkappaB kinases serve as a target of CD28 signaling. *J. Biol. Chem.* 273: 25185-25190.
- (20) TRUSHIN, S.A.; PENNINGTON, K.N.; ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. Y PAYA, C.V. (1999) Protein kinase C and calcineurin synergize to activate IkappaB kinase and NF-kappaB in t lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 22923-22931.
- (21) KAWABATA, H.; KAWAHARA, K.; KANEKURA, T.; ARAYA, N.; DAITOKU, H.; HATTA, M.; MIURA, N.; FUKAMIZU, A.; KANZAKI, T.; MARUYAMA, I. Y NAKAJIMA, T. (2002) Possible role of transcriptional coactivator P/CAF and nuclear acetylation in calcium-induced keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 277: 8099-8105.
- (22) ABELIOVICH, A.; PAYLOR, R.; CHEN, C.; KIM, J.J.; WEHNER, J.M. Y TONEGAWA, S. (1993) PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell*. 75: 1263-1271.
- (23) KANO, M.; HASHIMOTO, K.; CHEN, C.; ABELIOVICH, A.; AIBA, A.; KURIHARA, H.; WATANABE, M.; INOUE, Y. Y TONEGAWA, S. (1995) Impaired synapse elimination during cerebellar development in PKC gamma mutant mice. *Cell.* 83: 1223-1231.
- (24) TIMMERMAN, L.A.; CLIPSTONE, N.A.; Ho, S.N.; NORTHROP, J.P. Y CRABTREE, G.R. (1996) Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca2+ signals and immunosuppression. *Nature*. 383: 837-840.
- (25) Klauck, T.M.; Faux, M.C.; Labudda, K.; Langeberg, L.K.; Jaken, S. y Scott, J.D. (1996) Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science*. 271: 1589-1592.
- (26) Lai, M.M.; Burnett, P.E.; Wolosker, H.; Blackshaw, S. y Snyder, S.H. (1998) Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J. Biol. Chem.* 273: 18325-18331.
- (27) MISKIN, J.E.; ABRAMS, C.C. Y DIXON, L.K. (2000) African swine fever virus protein A2381 interacts with the cellular phosphatase calcineurin via a binding domain similar to that of NFAT. *J. Virol*. 74: 9412-9420.
- (28) RAKHILIN, S.V.; OLSON, P.A.; NISHI, A.; STARKOVA, N.N.; FIENBERG, A.A.; NAIRN, A.C.; SURMEIER, D.J. Y GREENGARD, P. (2004) A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. *Science*. 306: 698-701.

- (29) Sun, L.; Youn, H.D.; Loh, C.; Stolow, M.; He, W. Y Liu, J.O. (1998) Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*. 8: 703-711.
- (30) Lin, X.; Sikkink, R.A.; Rusnak, F. y Barber, D.L. (1999) Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *J. Biol. Chem.* 274: 36125-36131.
- (31) Davies, K.J.; Ermak, G.; Rothermel, B.A.; Pritchard, M.; Heitman, J.; Ahnn, J.; Henrique-Silva, F.; Crawford, D.; Canaider, S.; Strippoli, P.; Carinci, P.; Min, K.T.; Fox, D.S.; Cunningham, K.W.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N.; Zhang, Z.; Williams, R.S.; Gerber, H.P.; Perez-Riba, M.; Seo, H.; Cao, X.; Klee, C.B.; Redondo, J.M.; Maltais, L.J.; Bruford, E.A.; Povey, S.; Molkentin, J.D.; McKeon, F.D.; Duh, E.J.; Crabtree, G.R.; Cyert, M.S.; de la Luna, S. y Estivill, X. (2007) Renaming the Dscr1/Adapt78 gene family as RCAN: Regulators of calcineurin. *Faseb J.* 21: 3023-3028.
- (32) Kingsbury, T.J. y Cunningham, K.W. (2000) A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev.* 14: 1595-1604.
- (33) ROTHERMEL, B.A.; VEGA, R.B. Y WILLIAMS, R.S. (2003) The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc. Med.* 13: 15-21.
- (34) HILIOTI, Z.; GALLAGHER, D.A.; LOW-NAM, S.T.; RAMASWAMY, P.; GAJER, P.; KINGSBURY, T.J.; BIRCHWOOD, C.J.; LEVCHENKO, A. Y CUNNINGHAM, K.W. (2004) GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev.* 18: 35-47.
- (35) Mammucari, C.; Tommasi di Vignano, A.; Sharov, A.A.; Neilson, J.; Havrda, M.C.; Roop, D.R.; Botchkarev, V.A.; Crabtree, G.R. y Dotto, G.P. (2005) Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev. Cell.* 8: 665-676.
- (36) Berridge, M.J.; Lipp, P. Y Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 11-21.
- (37) Munch, G.; Bolck, B.; Karczewski, P. y Schwinger, R.H. (2002) Evidence for calcineurin-mediated regulation of SERCA2a activity in human myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 34: 321-334.
- (38) Chen, S.R.; Zhang, L. y MacLennan, D.H. (1994) Asymmetrical blockade of the Ca2+ release channel (ryanodine receptor) by 12-KDa FK506 binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 11953-11957.
- (39) CAMERON, A.M.; STEINER, J.P.; ROSKAMS, A.J.; ALI, S.M.; RONNETT, G.V. Y SNYDER, S.H. (1995) Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-Fkbp12 complex modulates Ca2+ flux. *Cell*. 83: 463-472.

- (40) Winder, D.G.; Mansuy, I.M.; Osman, M.; Moallem, T.M. y Kandel, E.R. (1998) Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell.* 92: 25-37.
- (41) Mansuy, I.M.; Mayford, M.; Jacob, B.; Kandel, E.R. y Bach, M.E. (1998) Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell.* 92: 39-49.
- (42) Barford, D.; Das, A.K. Y Egloff, M.P. (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27: 133-164.
- (43) Hubbard, M.J. Y Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 18: 172-177.
- (44) EL-Armouche, A.; Bednorz, A.; Pamminger, T.; Ditz, D.; Didie, M.; Dobrev, D. Y Eschenhagen, T. (2006) Role of calcineurin and protein phosphatase-2a in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346: 700-706.
- (45) ALLEN, P.B.; KWON, Y.G.; NAIRN, A.C. Y GREENGARD, P. (1998) Isolation and characterization of Pnuts, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit. *J. Biol. Chem.* 273: 4089-4095.
- (46) Lesage, B.; Beullens, M.; Nuytten, M.; Van Eynde, A.; Keppens, S.; Himpens, B. y Bollen, M. (2004) Interactor-mediated nuclear translocation and retention of protein phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 55978-55984.
- (47) Beullens, M.; Van Eynde, A.; Bollen, M. y Stalmans, W. (1993) Inactivation of nuclear inhibitory polypeptides of protein phosphatase-1 (nipp-1) by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 268: 13172-13177.
- (48) Kim, Y.M.; Watanabe, T.; Allen, P.B.; Kim, Y.M.; Lee, S.J.; Greengard, P.; Nairn, A.C. y Kwon, Y.G. (2003) Pnuts, a protein phosphatase 1 (PP1) nuclear targeting subunit. Characterization of its PP1- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278: 13819-13828.
- (49) Landsverk, H.B.; Kirkhus, M.; Bollen, M.; Kuntziger, T. y Collas, P. (2005) Pnuts enhances in vitro chromosome decondensation in a PP1-dependent manner. *Biochem. J.* 390: 709-717.
- (50) CANETTIERI, G.; MORANTTE, I.; GUZMAN, E.; ASAHARA, H.; HERZIG, S.; ANDERSON, S.D.; YATES, J.R., 3RD Y MONTMINY, M. (2003) Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. *Nat. Struct. Biol.* 10: 175-181.
- (51) Genoux, D.; Haditsch, U.; Knobloch, M.; Michalon, A.; Storm, D. y Mansuy, I.M. (2002) Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*. 418: 970-975.

- (52) BLITZER, R.D.; CONNOR, J.H.; BROWN, G.P.; WONG, T.; SHENOLIKAR, S.; IYENGAR, R. Y LANDAU, E.M. (1998) Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science*. 280: 1940-1942.
- (53) Cha-Molstad, H.; Keller, D.M.; Yochum, G.S.; Impey, S. y Goodman, R.H. (2004) Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 13572-13577.
- (54) Conkright, M.D.; Guzman, E.; Flechner, L.; Su, A.I.; Hogenesch, J.B. y Montminy, M. (2003) Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for camp responsiveness. *Mol. Cell.* 11: 1101-1108.
- (55) Zhang, S.L.; Yeromin, A.V.; Zhang, X.H.; Yu, Y.; Safrina, O.; Penna, A.; Roos, J.; Stauderman, K.A. y Cahalan, M.D. (2006) Genome-wide RNAi screen of Ca2+ influx identifies genes that regulate Ca2+ release-activated Ca2+ channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 9357-9362.
- (56) MAYR, B. Y MONTMINY, M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 599-609.
- (57) Hu, S.C.; Chrivia, J. y Ghosh, A. (1999) Regulation of CBP-mediated transcription by neuronal calcium signaling. *Neuron*. 22: 799-808.
- (58) IMPEY, S.; FONG, A.L.; WANG, Y.; CARDINAUX, J.R.; FASS, D.M.; OBRIETAN, K.; WAYMAN, G.A.; STORM, D.R.; SODERLING, T.R. Y GOODMAN, R.H. (2002) Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV. *Neuron*. 34: 235-244.
- (59) ALARCON, J.M.; MALLERET, G.; TOUZANI, K.; VRONSKAYA, S.; ISHII, S.; KANDEL, E.R. Y BARCO, A. (2004) Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: A model for the cognitive deficit in rubinstein-taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*. 42: 947-959.
- (60) Korzus, E.; Rosenfeld, M.G. y Mayford, M. (2004) CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*. 42: 961-972.
- (61) BOURTCHOULADZE, R.; LIDGE, R.; CATAPANO, R.; STANLEY, J.; GOSSWEILER, S.; ROMASHKO, D.; SCOTT, R. Y TULLY, T. (2003) A mouse model of rubinstein-taybi syndrome: Defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 10518-10522.
- (62) Sheng, M.; Thompson, M.A. y Greenberg, M.E. (1991) CREB: A Ca2+-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*. 252: 1427-1430.
- (63) BITTINGER, M.A.; McWhinnie, E.; Meltzer, J.; Iourgenko, V.; Latario, B.; Liu, X.; Chen, C.H.; Song, C.; Garza, D. y Labow, M. (2004) Activation of cAMP response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins. *Curr. Biol.* 14: 2156-2161.

- (64) SCREATON, R.A.; CONKRIGHT, M.D.; KATOH, Y.; BEST, J.L.; CANETTIERI, G.; JEFFRIES, S.; GUZMAN, E.; NIESSEN, S.; YATES, J.R., 3RD; TAKEMORI, H.; OKAMOTO, M. Y MONTMINY, M. (2004) The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell.* 119: 61-74.
- (65) IOURGENKO, V.; ZHANG, W.; MICKANIN, C.; DALY, I.; JIANG, C.; HEXHAM, J.M.; ORTH, A.P.; MIRAGLIA, L.; MELTZER, J.; GARZA, D.; CHIRN, G.W.; McWHINNIE, E.; COHEN, D.; SKELTON, J.; TERRY, R.; YU, Y.; BODIAN, D.; BUXTON, F.P.; ZHU, J.; SONG, C. Y LABOW, M.A. (2003) Identification of a family of cAMP response element-binding protein coactivators by genome-scale functional analysis in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 12147-12152.
- (66) Ledo, F.; Kremer, L.; Mellstrom, B. y Naranjo, J.R. (2002) Ca2+-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM. *Embo J.* 21: 4583-4592.
- (67) Black, B.L. y Olson, E.N. (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (Mef2) proteins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 167-196.
- (68) Youn, H.D.; Chatila, T.A. y Liu, J.O. (2000) Integration of calcineurin and Mef2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *Embo J.* 19: 4323-4331.
- (69) Lin, Q.; Schwarz, J.; Bucana, C. y Olson, E.N. (1997) Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor Mef2c. *Science*. 276: 1404-1407.
- (70) Mao, Z.; Bonni, A.; Xia, F.; Nadal-Vicens, M. y Greenberg, M.E. (1999) Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor Mef2. *Science*. 286: 785-790.
- (71) Lu, J.; McKinsey, T.A.; Nicol, R.L. y Olson, E.N. (2000) Signal-dependent activation of the Mef2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 4070-4075.
- (72) MISKA, E.A.; KARLSSON, C.; LANGLEY, E.; NIELSEN, S.J.; PINES, J. Y KOUZARIDES, T. (1999) HDAC4 deacetylase associates with and represses the Mef2 transcription factor. *Embo J.* 18: 5099-5107.
- (73) Wang, A.H.; Bertos, N.R.; Vezmar, M.; Pelletier, N.; Crosato, M.; Heng, H.H.; Th'ng, J.; Han, J. y Yang, X.J. (1999) HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7816-7827.
- (74) Lu, J.; McKinsey, T.A.; Zhang, C.L. y Olson, E.N. (2000) Regulation of skeletal myogenesis by association of the Mef2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol. Cell.* 6: 233-244.
- (75) Sparrow, D.B.; Miska, E.A.; Langley, E.; Reynaud-Deonauth, S.; Kotecha, S.; Towers, N.; Spohr, G.; Kouzarides, T. y Mohun, T.J. (1999) Mef-2 function is modified by a novel co-repressor, Mitr. *Embo J.* 18: 5085-5098.

- (76) JANG, H.; CHOI, D.E.; KIM, H.; CHO, E.J. Y YOUN, H.D. (2006) Cabin1 represses Mef2 transcriptional activity by association with a methyltransferase, Suv39h1. *J. Biol. Chem.* 282: 11172-11179.
- (77) Koo, S.H.; Flechner, L.; QI, L.; Zhang, X.; Screaton, R.A.; Jeffries, S.; Hedrick, S.; Xu, W.; Boussouar, F.; Brindle, P.; Takemori, H. y Montminy, M. (2005) The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*. 437: 1109-1111.
- (78) Youn, H.D.; Grozinger, C.M. Y Liu, J.O. (2000) Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J. Biol. Chem.* 275: 22563-22567.
- (79) Youn, H.D.; Sun, L.; Prywes, R. y Liu, J.O. (1999) Apoptosis of T cells mediated by Ca2+-induced release of the transcription factor Mef2. *Science*. 286: 790-793.
- (80) Belfield, J.L.; Whittaker, C.; Cader, M.Z. y Chawla, S. (2006) Differential effects of Ca2+ and cAMP on transcription mediated by Mef2d and cAMP-response element-binding protein in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 281: 27724-27732.
- (81) McKenzie, G.J.; Stevenson, P.; Ward, G.; Papadia, S.; Bading, H.; Chawla, S.; Privalsky, M. y Hardingham, G.E. (2005) Nuclear Ca2+ and cam kinase IV specify hormonal- and Notch-responsiveness. *J. Neurochem.* 93: 171-185.
- (82) McKinsey, T.A.; Zhang, C.L. y Olson, E.N. (2000) Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 14400-14405.
- (83) HABERLAND, M.; ARNOLD, M.A.; McAnally, J.; Phan, D.; Kim, Y. y Olson, E.N. (2007) Regulation of hdac9 gene expression by Mef2 establishes a negative-feedback loop in the transcriptional circuitry of muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 27: 518-525.
- (84) Martinowich, K.; Hattori, D.; Wu, H.; Fouse, S.; He, F.; Hu, Y.; Fan, G. y Sun, Y.E. (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*. 302: 890-893.
- (85) MAO, Z. Y WIEDMANN, M. (1999) Calcineurin enhances Mef2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons. *J. Biol. Chem.* 274: 31102-31107.
- (86) Hogan, P.G.; Chen, L.; Nardone, J. y Rao, A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17: 2205-2232.
- (87) RAO, A.; Luo, C. Y Hogan, P.G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 707-747.

- (88) Beals, C.R.; Sheridan, C.M.; Turck, C.W.; Gardner, P. y Crabtree, G.R. (1997) Nuclear export of NF-ACc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*. 275: 1930-1934.
- (89) Graef, I.A.; Mermelstein, P.G.; Stankunas, K.; Neilson, J.R.; Deisseroth, K.; Tsien, R.W. y Crabtree, G.R. (1999) L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ACc4 in hippocampal neurons. *Nature*. 401: 703-708.
- (90) Chow, C.W.; Rincon, M.; Cavanagh, J.; Dickens, M. y Davis, R.J. (1997) Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science*. 278: 1638-1641.
- (91) Yang, T. y Poovaiah, B.W. (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant. Sci.* 8: 505-512.
- (92) ARRON, J.R.; WINSLOW, M.M.; POLLERI, A.; CHANG, C.P.; WU, H.; GAO, X.; NEILSON, J.R.; CHEN, L.; HEIT, J.J.; KIM, S.K.; YAMASAKI, N.; MIYAKAWA, T.; FRANCKE, U.; GRAEF, I.A. Y CRABTREE, G.R. (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of Dscr1 and Dyrk1a on chromosome 21. *Nature*. 441: 595-600.
- (93) GWACK, Y.; SHARMA, S.; NARDONE, J.; TANASA, B.; IUGA, A.; SRIKANTH, S.; OKAMURA, H.; BOLTON, D.; FESKE, S.; HOGAN, P.G. Y RAO, A. (2006) A genome-wide drosophila RNAi screen identifies Dyrk-family kinases as regulators of NFAT. *Nature*. 441: 646-650.
- (94) Macian, F.; Garcia-Rodriguez, C. y Rao, A. (2000) Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of fos and jun. *Embo J.* 19: 4783-4795.
- (95) Baksh, S.; Widlund, H.R.; Frazer-Abel, A.A.; Du, J.; Fosmire, S.; Fisher, D.E.; DeCaprio, J.A.; Modiano, J.F. y Burakoff, S.J. (2002) NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol. Cell.* 10: 1071-1081.
- (96) Graef, I.A.; Chen, F.; Chen, L.; Kuo, A. y Crabtree, G.R. (2001) Signals transduced by Ca2+/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell.* 105: 863-875.
- (97) JOHNSON, E.N.; LEE, Y.M.; SANDER, T.L.; RABKIN, E.; SCHOEN, F.J.; KAUSHAL, S. Y BISCHOFF, J. (2003) NFATc1 mediates vascular endothelial growth factor-induced proliferation of human pulmonary valve endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 278: 1686-1692.
- (98) Graef, I.A.; Wang, F.; Charron, F.; Chen, L.; Neilson, J.; Tessier-Lavigne, M. Y Crabtree, G.R. (2003) Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell.* 113: 657-670.
- (99) Kuhara, A.; Inada, H.; Katsura, I. y Mori, I. (2002) Negative regulation and gain control of sensory neurons by the *C. elegans* calcineurin Tax-6. *Neuron*. 33: 751-763.

- (100) AN, W.F.; BOWLBY, M.R.; BETTY, M.; CAO, J.; LING, H.P.; MENDOZA, G.; HINSON, J.W.; MATTSSON, K.I.; STRASSLE, B.W.; TRIMMER, J.S. Y RHODES, K.J. (2000) Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*. 403: 553-556.
- (101) BUXBAUM, J.D.; CHOI, E.K.; LUO, Y.; LILLIEHOOK, C.; CROWLEY, A.C.; MERRIAM, D.E. Y WASCO, W. (1998) Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat. Med.* 4: 1177-1181.
- (102) CARRION, A.M.; LINK, W.A.; LEDO, F.; MELLSTROM, B. Y NARANJO, J.R. (1999) DREAM is a Ca2+-regulated transcriptional repressor. *Nature*. 398: 80-84.
- (103) Link, W.A.; Ledo, F.; Torres, B.; Palczewska, M.; Madsen, T.M.; Savignac, M.; Albar, J.P.; Mellstrom, B. y Naranjo, J.R. (2004) Day-night changes in downstream regulatory element antagonist modulator/potassium channel interacting protein activity contribute to circadian gene expression in pineal gland. *J. Neurosci.* 24: 5346-5355.
- (104) Craig, T.A.; Benson, L.M.; Venyaminov, S.Y.; Klimtchuk, E.S.; Bajzer, Z.; Prendergast, F.G.; Naylor, S. y Kumar, R. (2002) The metal-binding properties of DREAM: Evidence for calcium-mediated changes in DREAM structure. *J. Biol. Chem.* 277: 10955-10966.
- (105) OSAWA, M.; TONG, K.I.; LILLIEHOOK, C.; WASCO, W.; BUXBAUM, J.D.; CHENG, H.Y.; PENNINGER, J.M.; IKURA, M. Y AMES, J.B. (2001) Calcium-regulated DNA binding and oligomerization of the neuronal calcium-sensing protein, calsenilin/DREAM/KChIP3. *J. Biol. Chem.* 276: 41005-41013.
- (106) Gomez-Villafuertes, R.; Torres, B.; Barrio, J.; Savignac, M.; Gabellini, N.; Rizzato, F.; Pintado, B.; Gutierrez-Adan, A.; Mellstrom, B.; Carafoli, E. y Naranjo, J.R. (2005) Downstream regulatory element antagonist modulator regulates Ca2+ homeostasis and viability in cerebellar neurons. *J. Neurosci.* 25: 10822-10830.
- (107) Ledo, F.; Carrion, A.M.; Link, W.A.; Mellstrom, B. y Naranjo, J.R. (2000) DREAM-alphaCREM interaction via leucine-charged domains derepresses downstream regulatory element-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9120-9126.
- (108) Sanz, C.; Mellstrom, B.; Link, W.A.; Naranjo, J.R. y Fernandez-Luna, J.L. (2001) Interleukin 3-dependent activation of DREAM is involved in transcriptional silencing of the apoptotic Hrk gene in hematopoietic progenitor cells. *Embo J.* 20: 2286-2292.
- (109) Hu, X. Y Lazar, M.A. (1999) The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*. 402: 93-96.

- (110) LE DOUARIN, B.; NIELSEN, A.L.; GARNIER, J.M.; ICHINOSE, H.; JEANMOUGIN, F.; LOSSON, R. Y CHAMBON, P. (1996) A possible involvement of Tif1 alpha and Tif1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *Embo J.* 15: 6701-6715.
- (111) TORCHIA, J.; ROSE, D.W.; INOSTROZA, J.; KAMEI, Y.; WESTIN, S.; GLASS, C.K. Y ROSENFELD, M.G. (1997) The transcriptional co-activator P/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*. 387: 677-684.
- (112) RIVAS, M.; MELLSTROM, B.; NARANJO, J.R. Y SANTISTEBAN, P. (2004) Transcriptional repressor DREAM interacts with thyroid transcription factor-1 and regulates thyroglobulin gene expression. *J. Biol. Chem.* 279: 33114-33122.
- (113) Scsucova, S.; Palacios, D.; Savignac, M.; Mellstrom, B.; Naranjo, J.R. y Aranda, A. (2005) The repressor DREAM acts as a transcriptional activator on vitamin D and retinoic acid response elements. *Nucleic Acids Res.* 33: 2269-2279.
- (114) Ou, X.M.; Lemonde, S.; Jafar-Nejad, H.; Bown, C.D.; Goto, A.; Rogaeva, A. y Albert, P.R. (2003) Freud-1: a neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1a receptor gene. *J. Neurosci.* 23: 7415-7425.
- (115) CARRION, A.M.; MELLSTROM, B. Y NARANJO, J.R. (1998) Protein kinase A-dependent derepression of the human prodynorphin gene via differential binding to an intragenic silencer element. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6921-6929.
- (116) Gomez, M.; De Castro, E.; Guarin, E.; Sasakura, H.; Kuhara, A.; Mori, I.; Bartfai, T.; Bargmann, C.I. y Nef, P. (2001) Ca2+ signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans. Neuron.* 30: 241-248.
- (117) Cheng, H.Y.; Laviolette, S.R.; van der Kooy, D. y Penninger, J.M. (2004) Dream ablation selectively alters THC place aversion and analgesia but leaves intact the motivational and analgesic effects of morphine. *Eur. J. Neurosci.* 19: 3033-3041.
- (118) GHOSH, S.; MAY, M.J. Y KOPP, E.B. (1998) NF-kappaB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260.
- (119) ISRAEL, A. (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell. Biol.* 10: 129-133.
- (120) Beg, A.A.; Ruben, S.M.; Scheinman, R.I.; Haskill, S.; Rosen, C.A. y Baldwin, A.S., Jr. (1992) IkappaB interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappaB: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev.* 6: 1899-1913.
- (121) Brown, K.; Gerstberger, S.; Carlson, L.; Franzoso, G. y Siebenlist, U. (1995) Control of IkappaB-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*. 267: 1485-1488.

- (122) SCHAFFAR, G.; BREUER, P.; BOTEVA, R.; BEHRENDS, C.; TZVETKOV, N.; STRIPPEL, N.; SAKAHIRA, H.; SIEGERS, K.; HAYER-HARTL, M. Y HARTL, F.U. (2004) Cellular to-xicity of polyglutamine expansion proteins: Mechanism of transcription factor deactivation. *Mol. Cell.* 15: 95-105.
- (123) Hughes, K.; Edin, S.; Antonsson, A. y Grundstrom, T. (2001) Calmodulin-dependent kinase II mediates T cell receptor/CD3- and phorbol ester-induced activation of IkappaB kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 36008-36013.
- (124) Meffert, M.K.; Chang, J.M.; Wiltgen, B.J.; Fanselow, M.S. y Baltimore, D. (2003) NF-kappaB functions in synaptic signaling and behavior. *Nat. Neurosci*. 6: 1072-1078.
- (125) AIZAWA, H.; Hu, S.C.; Bobb, K.; BALAKRISHNAN, K.; INCE, G.; GUREVICH, I.; Cowan, M. Y Ghosh, A. (2004) Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science*. 303: 197-202.
- (126) REDMOND, L. Y GHOSH, A. (2005) Regulation of dendritic development by calcium signaling. *Cell. Calcium*. 37: 411-416.
- (127) PRADHAN, A. Y LIU, Y. (2005) A multifunctional domain of the calcium-responsive transactivator (CREST) that inhibits dendritic growth in cultured neurons. *J. Biol. Chem.* 280: 24738-24743.
- (128) Hulme, J.T.; Yarov-Yarovoy, V.; Lin, T.W.; Scheuer, T. y Catterall, W.A. (2006) Autoinhibitory control of the Cav1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J. Physiol.* 576: 87-102.
- (129) Gomez-Ospina, N.; Tsuruta, F.; Barreto-Chang, O.; Hu, L. y Dolmetsch, R. (2006) The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Cav1.2 encodes a transcription factor. *Cell.* 127: 591-606.
- (130) NARANJO, J.R. Y MELLSTROM, B. (2007) Split personality of transcription factors inside and outside the nuclear border. *Sci. STKE*. 2007: pe5.
- (131) Roy, A.L.; Du, H.; Gregor, P.D.; Novina, C.D.; Martinez, E. y Roeder, R.G. (1997) Cloning of an inr- and E-box-binding protein, TFII-I, that interacts physically and functionally with USF1. *Embo J.* 16: 7091-7104.
- (132) Hell, J.W.; Westenbroek, R.E.; Warner, C.; Ahlijanian, M.K.; Prystay, W.; Gilbert, M.M.; Snutch, T.P. y Catterall, W.A. (1993) Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J. Cell. Biol.* 123: 949-962.
- (133) Kubodera, T.; Yokota, T.; Ohwada, K.; Ishikawa, K.; Miura, H.; Matsuoka, T. y Mizusawa, H. (2003) Proteolytic cleavage and cellular toxicity of the human alpha1a calcium channel in spinocerebellar ataxia type 6. *Neurosci. Lett.* 341: 74-78.

- (134) WESTENBROEK, R.E.; HELL, J.W.; WARNER, C.; DUBEL, S.J.; SNUTCH, T.P. Y CATTERALL, W.A. (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron*. 9: 1099-1115.
- (135) KORDASIEWICZ, H.B.; THOMPSON, R.M.; CLARK, H.B. Y GOMEZ, C.M. (2006) C-termini of P/Q-type Ca2+ channel alpha1a subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 15: 1587-1599.
- (136) CORNELIUSSEN, B.; HOLM, M.; WALTERSSON, Y.; ONIONS, J.; HALLBERG, B.; THORNELL, A. Y GRUNDSTROM, T. (1994) Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature*. 368: 760-764.
- (137) Burns, K.; Duggan, B.; Atkinson, E.A.; Famulski, K.S.; Nemer, M.; Bleackley, R.C. y Michalak, M. (1994) Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*. 367: 476-480.
- (138) Dedhar, S.; Rennie, P.S.; Shago, M.; Hagesteijn, C.Y.; Yang, H.; Filmus, J.; Hawley, R.G.; Bruchovsky, N.; Cheng, H.; Matusik, R.J. y Giguere, V. (1994) Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature*. 367: 480-483.
- (139) HOEFLICH, K.P. Y IKURA, M. (2002) Calmodulin in action: Diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell.* 108: 739-742.
- (140) STRYNADKA, N.C. Y JAMES, M.N. (1989) Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 951-998.
- (141) Onions, J.; Hermann, S. y Grundstrom, T. (2000) A novel type of calmodulin interaction in the inhibition of basic helix-loop-helix transcription factors. *Biochemistry*. 39: 4366-4374.
- (142) BAUDIER, J.; BERGERET, E.; BERTACCHI, N.; WEINTRAUB, H.; GAGNON, J. Y GARIN, J. (1995) Interactions of myogenic bHLH transcription factors with calcium-binding calmodulin and S100a (alpha alpha) proteins. *Biochemistry*. 34: 7834-7846.
- (143) Lenormand, J.L.; Benayoun, B.; Guillier, M.; Vandromme, M.; Leibovitch, M.P. y Leibovitch, S.A. (1997) Mos activates myogenic differentiation by promoting heterodimerization of MyoD and E12 proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17: 584-593.
- (144) Massari, M.E. y Murre, C. (2000) Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* 20: 429-440.
- (145) Ince-Dunn, G.; Hall, B.J.; Hu, S.C.; Ripley, B.; Huganir, R.L.; Olson, J.M.; Tapscott, S.J. y Ghosh, A. (2006) Regulation of thalamocortical patterning and synaptic maturation by neuroD2. *Neuron*. 49: 683-695.
- (146) Hong, C.S. y Saint-Jeannet, J.P. (2005) Sox proteins and neural crest development. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 16: 694-703.

- (147) Argentaro, A.; Sim, H.; Kelly, S.; Preiss, S.; Clayton, A.; Jans, D.A. y Harley, V.R. (2003) A Sox9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J. Biol. Chem.* 278: 33839-33847.
- (148) Holaska, J.M.; Black, B.E.; Love, D.C.; Hanover, J.A.; Leszyk, J. y Paschal, B.M. (2001) Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J. Cell. Biol.* 152: 127-140.
- (149) Holaska, J.M.; Black, B.E.; Rastinejad, F. y Paschal, B.M. (2002) Ca2+-dependent nuclear export mediated by calreticulin. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6286-6297.
- (150) MICHALAK, M.; BURNS, K.; ANDRIN, C.; MESAELI, N.; JASS, G.H.; BUSAAN, J.L. Y OPAS, M. (1996) Endoplasmic reticulum form of calreticulin modulates glucocorticoid-sensitive gene expression. *J. Biol. Chem.* 271: 29436-29445.
- (151) DeFranco, D.B. (2001) Nuclear export: DNA-binding domains find a surprising partner. *Curr. Biol.* 11: R1036-1037.
- (152) Feng, J.L. y Villeponteau, B. (1990) Serum stimulation of the c-fos enhancer induces reversible changes in c-fos chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1126-1133.
- (153) KARDALINOU, E.; ZHELEV, N.; HAZZALIN, C.A. Y MAHADEVAN, L.C. (1994) Anisomycin and rapamycin define an area upstream of p70/85S6k containing a bifurcation to histone H3-HMG-like protein phosphorylation and c-fos-c-jun induction. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1066-1074.
- (154) DING, H.F.; RIMSKY, S.; BATSON, S.C.; BUSTIN, M. Y HANSEN, U. (1994) Stimulation of RNA polymerase II elongation by chromosomal protein HMG-14. *Science*. 265: 796-799.
- (155) WHITLOCK, J.P., JR.; GALEAZZI, D. Y SCHULMAN, H. (1983) Acetylation and calcium-dependent phosphorylation of histone H3 in nuclei from butyrate-treated HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 258: 1299-1304.
- (156) CLAYTON, A.L.; Rose, S.; Barratt, M.J. y Mahadevan, L.C. (2000) Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *Embo J.* 19: 3714-3726.
- (157) SACCANI, S. Y NATOLI, G. (2002) Dynamic changes in histone H3 lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes. *Genes Dev.* 16: 2219-2224.
- (158) Wakim, B.T. y Aswad, G.D. (1994) Ca2+-calmodulin-dependent phosphorylation of arginine in histone 3 by a nuclear kinase from mouse leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 269: 2722-2727.
- (159) Soloaga, A.; Thomson, S.; Wiggin, G.R.; Rampersaud, N.; Dyson, M.H.; Hazzalin, C.A.; Mahadevan, L.C. y Arthur, J.S. (2003) Msk2 and msk1 mediate

- the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *Embo J.* 22: 2788-2797.
- (160) Thomson, S.; CLAYTON, A.L.; HAZZALIN, C.A.; Rose, S.; BARRATT, M.J. Y MAHADEVAN, L.C. (1999) The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: Msk1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *Embo J.* 18: 4779-4793.
- (161) DEAK, M.; CLIFTON, A.D.; LUCOCQ, L.M. Y ALESSI, D.R. (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (Msk1) is directly activated by MAPK and sapk2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J.* 17: 4426-4441.
- (162) Vermeulen, L.; De Wilde, G.; Van Damme, P.; Vanden Berghe, W. y Haegeman, G. (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (Msk1). *Embo J.* 22: 1313-1324.
- (163) Chadee, D.N.; Hendzel, M.J.; Tylipski, C.P.; Allis, C.D.; Bazett-Jones, D.P.; Wright, J.A. y Davie, J.R. (1999) Increased ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 274: 24914-24920.
- (164) BUTCHER, G.Q.; LEE, B.; CHENG, H.Y. Y OBRIETAN, K. (2005) Light stimulates msk1 activation in the suprachiasmatic nucleus via a PACAP-ERK/MAP kinase-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 25: 5305-5313.
- (165) Crosio, C.; Cermakian, N.; Allis, C.D. y Sassone-Corsi, P. (2000) Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nat. Neurosci.* 3: 1241-1247.
- (166) OBRIETAN, K.; IMPEY, S.; SMITH, D.; ATHOS, J. Y STORM, D.R. (1999) Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J. Biol. Chem.* 274: 17748-17756.
- (167) SILVERSTEIN, R.A. Y EKWALL, K. (2005) Sin3: A flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr. Genet.* 47: 1-17.
- (168) ALLAND, L.; MUHLE, R.; HOU, H., JR.; POTES, J.; CHIN, L.; SCHREIBER-AGUS, N. Y DEPINHO, R.A. (1997) Role for n-cor and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature*. 387: 49-55.
- (169) Heinzel, T.; Lavinsky, R.M.; Mullen, T.M.; Soderstrom, M.; Laherty, C.D.; Torchia, J.; Yang, W.M.; Brard, G.; Ngo, S.D.; Davie, J.R.; Seto, E.; Eisenman, R.N.; Rose, D.W.; Glass, C.K. y Rosenfeld, M.G. (1997) A complex containing n-cor, msin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*. 387: 43-48.
- (170) GUENTHER, M.G.; Yu, J.; KAO, G.D.; YEN, T.J. Y LAZAR, M.A. (2002) Assembly of the Smrt-histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex. *Genes Dev.* 16: 3130-3135.

- (171) Lee, H.; Rezai-Zadeh, N. y Seto, E. (2004) Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* 24: 765-773.
- (172) PFLUM, M.K.; TONG, J.K.; LANE, W.S. Y SCHREIBER, S.L. (2001) Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J. Biol. Chem.* 276: 47733-47741.
- (173) Tsai, S.C. y Seto, E. (2002) Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2. J. Biol. Chem. 277: 31826-31833.
- (174) Odom, A.R.; Stahlberg, A.; Wente, S.R. y York, J.D. (2000) A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science*. 287: 2026-2029.
- (175) Shen, X.; Xiao, H.; Ranallo, R.; Wu, W.H. Y Wu, C. (2003) Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates. *Science*. 299: 112-114.
- (176) STEGER, D.J.; HASWELL, E.S.; MILLER, A.L.; WENTE, S.R. Y O'SHEA, E.K. (2003) Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science*. 299: 114-116.

8. Modelos animales de enfermedades neurodegenerativas: ejemplo de la enfermedad de Huntington

JOSÉ J. LUCAS Y ZAIRA ORTEGA

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías muy complejas que tienen como características comunes el carácter progresivo de los síntomas y la degeneración paulatina de una parte o partes del sistema nervioso que desemboca en incapacidad física y psíquica. Las técnicas que se utilizan para el estudio de estas enfermedades son de muy distinta naturaleza. La generación de modelos animales para su estudio ha supuesto un gran avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, así como en la identificación de dianas terapeúticas. Además, representan la forma más fiel de reproducir la enfermedad y son óptimos para el estudio global de las patologías. La mayoría de los modelos animales que se generan en la actualidad son modelos genéticos en los cuales se reproduce la enfermedad integrando en el genoma del animal, o eliminando del mismo, las mutaciones responsables de la patología. También existe la posibilidad de generar modelos animales químicamente inducidos en aquellos casos en los que la causa de la enfermedad no tenga un origen genético o no se conozca. La especie animal más utilizada hasta hace poco en los laboratorios eran los roedores. En la actualidad, cada vez están apareciendo un mayor número de modelos animales generados en mamíferos superiores cuyo sistema nervioso es más similar al de los humanos y el desarrollo de la patología se asemeja más a la que tiene lugar en los pacientes.

Palabras clave: Transgénico. Knock-in. Knock-out. Transactivador. Inducible.

ABSTRACT

Animal models of neurodegenerative diseases: Huntington's disease as an example

Neurodegenerative diseases are very complex and their biological causes vary from one to another, but all of them have some characteristics in common: the progressive worsening of the symptoms and the degeneration of different components of the central nervous system that entails physical and mental disabilities. The generation of animal models to study these pathologies means a great advance in the knowledge of the metabolic pathways involved in the diseases, and helps to find out possible therapeutic targets. They are also the most physiological approach to perform global analysis of these diseases. Most of these animal models reproduce the pathogenesis by inserting or removing, from the animal genome, the mutation responsible for the disease. They can also be chemically generated when the cause of the disease is not genetic or known. The most used animals in the laboratories are rodents but, lately, some laboratories are starting to use higher mammals to create new animal models to take advantage of the fact that their central nervous system is more similar to the human one, thus better resembling the human pathology.

Keywords: Transgenic. Knock-in. Knock-out. Transactivator. Inducible.

LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Las primeras referencias que se tienen sobre la existencia de una enfermedad conocida vulgarmente como corea (derivada de la palabra choreus = baile), y que hace referencia a una «manía danzante», son del siglo XIV. La primera descripción médica la hizo Paracelso (1493-1541), pero no fue hasta la descripción que hizo de ella el doctor George Huntington en el *Medical and Surgical Reporter* (1), cuando se empezó a conocer formalmente como Enferme-

Abreviaturas: EH, Enfermedad de Huntington; SN, Sustancia Nigra; GP, Globo Pálido; NST, Núcleo Subtalámico; Htt, Huntingtina; PoliQ, poliglutamina; SCA, Ataxia Espinocerebelosa; DRPL, Atrofia Dentatorubro-Palidoluisiana; SBMA, Atrofia Muscular Espinobulbar; C. Elegans, Caenorhabditis elegans; Aa, aminoácido; Htt*, huntingtina mutada; AQ, Ácido Quinolínico; NMDA, N-metil-D-aspartato; GFAP, proteína acídica fibrilar glial; CNTF, Factor Neurotrófico Ciliar; BDNF, Factor neurotrófico derivado de cerebro; GDNF, Factor Neurotrófico derivado de glía; ATP, Adenosín trifosfato; 3-NP, Ácido 3-nitropropiónico; ROS, Especies reactivas de oxígeno; AAV, Virus adeno-asociados; YAC, Cromosoma artificial de levaduras.

dad de Huntington (EH). En esta publicación se establece por primera vez la edad de comienzo, después de los 40 años, la tendencia a la locura y al suicidio, y el carácter hereditario de la enfermedad. En la actualidad, la EH se define como un trastorno neurodegenerativo, autosómico, dominante, que comienza hacia la mitad de la vida (40 años aproximadamente) y que termina con la muerte del individuo después de aproximadamente 15 años de enfermedad (2). Lo más característico de esta enfermedad son los síntomas motores, conocidos como «corea», que consisten en movimientos involuntarios que están presentes de forma continuada durante varias horas, que no pueden ser suprimidos voluntariamente por el paciente y que empeoran con el estrés. Las causas de la muerte son principalmente infecciones tipo neumonía (42%), problemas cardiovasculares (33%) y, en menor medida, el suicidio (3%) y el cáncer (3%) (3). La prevalencia, en la mayoría de las poblaciones de origen europeo, es de aproximadamente 1 de cada 10.000 individuos (4). Existen pequeñas áreas de prevalencia particularmente alta y baja relacionada con los orígenes étnicos de estas poblaciones y con los orígenes de la EH en ese país, pero la posibilidad de viajar y la mezcla de razas, hace que, actualmente, la prevalencia de la EH sea relativamente estable en todo el mundo.

SINTOMATOLOGÍA Y NEUROPATOLOGÍA DE LA EH

Las manifestaciones clínicas características de la EH consisten en disfunción motora, declive cognitivo y trastornos psicopatológicos que se desarrollan a lo largo de 10-15 años, y que terminan con la muerte del individuo (2). Aunque la edad media de inicio suele ser los 40 años, existen casos en los que la enfermedad comienza a manifestarse a los 2 años (formas juveniles), y otros en los que se desarrolla a los 70-80 años (formas tardías o seniles) (5). A pesar de existir estas grandes diferencias en la edad de comienzo de la enfermedad, no existen grandes diferencias en la duración de la misma (10-15 años) (6). En todos los estudios realizados está muy bien establecida la edad de aparición de los síntomas (5-8), pero resulta mucho más complicado determinar la edad de inicio de la enfermedad ya que, anteriores a los síntomas obvios de disfunción extrapiramidal detectables con exámenes motores o neurológicos (hasta 3 años antes), se desarrollan otras anormalidades motoras menores (temblor general, movimientos anormales de los ojos, hiperreflexia, movimiento excesivo e inapropiado de los dedos, manos y pies durante estrés emocional, etc.) que pueden pasar inadvertidas (9).

Los síntomas extrapiramidales que sufren los pacientes de EH se producen como consecuencia de la atrofia de distintas áreas cerebrales. La neuropatología de la EH incluye atrofia y gliosis del caudado y putamen, con pérdida específica de las neuronas GABAérgicas del estriado denominadas neuronas espinosas de tamaño medio que proyectan a la sustancia nigra (SN) y al Globo Pálido (GP) (10). En menor medida, también se encuentran afectadas las neuronas piramidales de las capas III, V y VI de la corteza (11, 12). Según va progresando la enfermedad, la pérdida neuronal se va extendiendo a otras regiones cerebrales como el GP y del Núcleo Subtalámico (NST). Ya en las últimas fases de la enfermedad empieza la degeneración del tálamo, la SN, el hipocampo, la médula espinal y otros (12, 13).

La degeneración del estriado (área más afectada en la enfermedad) produce un aumento de los movimientos involuntarios (tirones de la cabeza, cuello y extremidades, movimientos faciales y muecas), así como movimientos más lentos de lo normal y rigidez (14). La degeneración de la corteza, que como ya hemos visto es la segunda área más afectada, da lugar a déficits en la memoria de trabajo, en la habilidad de establecer una tarea, y en la habilidad para pasar de una a otra, cuando se da en la corteza prefrontal (involucrada en procesos cognitivos complejos); depresión y trastornos obsesivo compulsivo, síntomas que en los enfermos de EH aparecen simultáneamente a los síntomas motores, cuando afecta a la corteza orbitofrontal; e inhibición de la respuesta y apatía cuando se produce en territorios corticales paralímbicos (15). En estadios posteriores, en los que ya se detecta degeneración del GP y del NST, se observan movimientos mucho más lentos, posturas anormales, dificultad en la relajación de los músculos y movimientos involuntarios de larga duración (hemiballismus) que se parecen a la corea, por ser repentinos y aleatorios, pero de mucha mayor amplitud. Esto concuerda con el progresivo empeoramiento de la rigidez y disminución de la hiperquinesia que sufren los enfermos de EH con el tiempo. La atrofia de la SN y del tálamo en los estadios más terminales de la EH produce la aparición de movimientos involuntarios de los ojos (16), bradiquinesia, aquinesia, rigidez muscular y temblor en descanso, y dificultad para prestar atención.

MUTACIÓN RESPONSABLE DE LA ENFERMEDAD

La mutación responsable de la EH consiste en una expansión, en el extremo 5´ del gen que codifica por la proteína huntingtina (htt), de los tripletes CAG que codifica por una secuencia de poliglutaminas (poliQ) (17-19). Los individuos sanos tienen entre 11-35 repeticiones de CAG, mientras que los enfermos de EH tienen más de 37 repeticiones. Además de la EH existen otras 8 enfer-

medades neurodegenerativas hereditarias causadas por expansión de poliQs en el extremo N-terminal de distintas proteínas no relacionadas entre ellas. Estas enfermedades son: las Ataxias Espinocerebelosas (SCAs) -1, -2, -3, -6, -7, y -17; la Atrofia Dentatorubro-Palidoluisiana (DRPL) y la Atrofia Muscular Espinobulbar (SBMA) (20, 21). En todas las enfermedades el límite patogénico se encuentra alrededor de 40 repeticiones, aumentando la severidad de la enfermedad y comenzando antes según aumenta el número de repeticiones (22). El hecho de que todas estas enfermedades desarrollen síndromes neurodegenerativos similares sin tener en cuenta la diferente naturaleza de las proteínas que llevan la mutación y la expresión ubicua de las mismas, sugiere fuertemente la teoría de que es una ganancia de función tóxica de la proteína lo que da lugar a la enfermedad, y de que existe una vulnerabilidad selectiva de las neuronas a las poliQs (en el caso de la EH son las neuronas GABAérgicas del estriado las más afectadas). Esta vulnerabilidad selectiva de distintos grupos neuronales en las distintas enfermedades causadas por poliQ también sugiere la posible implicación de la pérdida parcial de la función de la proteína en esos tipos celulares el desarrollo de estas enfermedades.

Otra característica común a todas las enfermedades causadas por expansión de poliQ es la presencia de agregados proteicos intraneuronales, que se detectan con anticuerpos anti-huntingtina y anti-ubiquitina, formados por la acumulación de las proteínas que llevan la poliQ. Este hecho resulta muy curioso ya que se ha demostrado que el número mínimo de repeticiones de CAG necesarias para que se produzca agregación in vitro está en torno a 40 (23), y como hemos mencionado anteriormente, el límite patogénico de expansión de poliQs de todas estas enfermedades está en torno a 40 repeticiones (22). Estos agregados se encuentran representados con distintas densidades en varias áreas del cerebro. En la EH son muy numerosos en la corteza, especialmente en capas 5 y 6, incluso en estadios de la enfermedad en la que no se ha producido todavía degeneración cortical (24, 25). La frecuencia de inclusiones en la corteza es directamente proporcional al tamaño de la expansión de poliQ e inversamente proporcional a la edad de inicio y muerte de la enfermedad (26). En el estriado, aunque es el área más afectada en la EH, la presencia de agregados es poco común, encontrándose principalmente en las neuronas espinosas de tamaño medio (24, 25). En otras estructuras como el globo pálido, el cerebelo (tanto en la capa molecular como en la granular), la SN, el NST o el hipocampo también son bastante escasos.

Dentro de las neuronas, las inclusiones son principalmente intranucleares localizadas de forma variable a lo largo de la superficie del núcleo (25). Un análisis más detallado de la composición de estos agregados concluyó que están compuestos por un cuerpo esférico con una densidad electrónica muy fuerte y estructuras filamentosas en su superficie orientadas al azar o paralelamente unas a otras. Además se vio que no están separados por membrana del nucleoplasma (25, 27). También se detectó la presencia en los mismos de otras proteínas diferentes a la htt como la histona H3, la histona H4, la proteína hnRNPH, la hnRNPF, etc (27).

MODELOS ANIMALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La EH es una enfermedad en la que todavía se desconocen muchos aspectos de los mecanismos que están implicados en ella, por ello, actualmente no existen tratamientos eficaces para retrasar su comienzo o para enlentecer su progreso. Pero es un paradigma de enfermedad neurodegenerativa para producir modelos animales ya que está causada por una única mutación muy bien conocida y caracterizada, y además confiere una ganancia de función tóxica a la proteína que expresa la mutación.

Los modelos animales suponen un gran avance en este aspecto ya que nos permiten realizar distintos abordajes experimentales para averiguar los posibles mecanismos involucrados en la patología, así como identificar dianas terapéuticas o comprobar el efecto de potenciales tratamientos en estados patológicos, celulares y moleculares tempranos de la enfermedad, que sería imposible realizar *in vivo* en pacientes de EH.

Los modelos animales más ampliamente estudiados y utilizados son los de roedores aunque, recientemente, han comenzado a utilizarse con bastante regularidad primates no humanos. También se utilizan, aunque en menor medida, otras especies de invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*. Estos modelos de invertebrados permiten un análisis rápido de las hipótesis y probar nuevas estrategias terapéuticas.

1. CAENORHABDITIS ELEGANS COMO MODELO DE LA EH:

Caenorhabditis elegans (C.elegans) es un nematodo muy utilizado para el estudio de la biología del desarrollo. C elegans posee algunas características muy interesantes:

- 1. No tiene el gen ortólogo de la htt.
- 2. No posee poliQ en ninguna proteína.

Ambas características son muy útiles para un modelo de EH ya que supone que el fenotipo que desarrollen será debido únicamente al transgen que se les ha insertado (28). Además:

- 1. Se conoce su genoma completo, posee cerca de 97 millones de pares de bases nitrogenadas, y más de 19000 genes.
- 2. Contiene ortólogos de algunas de las proteínas que interaccionan con la htt, y se ha visto que, *in vitro*, son capaces de interaccionar con la construcción de htt insertada (29). Esto posibilita la realización de estudios de interacción proteína-proteína (30).
- 3. El uso de *Caenorhabditis elegans* resulta conveniente en estudios biológicos por su corto periodo de gestación y gran cantidad de progenie.
- 4. Es transparente a lo largo de toda su vida, lo que facilita la observación de su desarrollo temprano bajo el microscopio.
- 5. Es hermafrodita, lo que favorece la obtención y mantenimiento de individuos con mutaciones recesivas.
- 6. Es muy simple, por ejemplo en cuanto a número celular (unas 1000 células), lo que ha permitido caracterizar cómo se genera cada linaje celular a lo largo del desarrollo.

En esta especie está descrito un modelo transgénico que se generó insertando al azar en el genoma de *C. elegans* una construcción formada por los primeros 57 aminoácidos (aa) de la htt humana con una expansión de poliQ patogénica, bajo el control de un promotor que sólo se expresa en las neuronas mecanosensoriales (31). El fenotipo observado es un déficit mecanosensorial en la cola, anormalidades morfológicas axonales y disfunción neuronal directamente proporcional a la longitud de la poliQ. Todo ello sucede en ausencia de muerte neuronal. Además también se observan acumulaciones proteicas perinucleares, pero éstas no son consecuencia de la patogenicidad de la poliQ ya que también están presentes cuando se expresan longitudes no patogénicas de poliQ (32). Estos resultados nos permiten afirmar que la disfunción neuronal es un proceso independiente de muerte neuronal y de la presencia de agregados, aunque si correlaciona con cierto grado de agregación y anormalidades morfológicas axonales.

Este modelo se utiliza principalmente para realizar screenings y hallar posibles candidatos y rutas que regulen o estén dañados en la EH (33, 34).

2. DROSOPHILA MELANOGASTER COMO MODELO DE EH

La *Drosophila melanogaster*, o mosca de la fruta, es uno de los mejores invertebrados para utilizar como modelo de enfermedades de organismos superiores ya que:

- 1. El análisis comparativo de su genoma con el humano revela que al menos un 50% de los genes son similares a los de los humanos (35).
- 2. De los genes que están asociados a alguna enfermedad en humanos, el 75% aproximadamente tienen ortólogo en *Drosophila* (36).
- 3. Tiene un sistema nervioso con una estructura que separa funciones como la visión, el olfato, el aprendizaje y la memoria de una forma similar al del sistema nervioso de mamíferos (37-39).
- 4. El ojo de *Drosophila* está compuesto por centenares de conjuntos de neuronas fotorreceptoras por lo que cualquier variación en el patrón es bastante evidente.
- 5. Es muy fácil su manipulación genética y conseguir que un gen extraño se exprese de forma específica de tejido o temporalmente. Además existen gran cantidad de herramientas genéticas comerciales adecuadas para su uso en este organismo.
- 6. El periodo de gestación dura aproximadamente 10 días (desde la fertilización hasta que el huevo eclosiona) por lo que es posible obtener animales para experimentación, con múltiples variantes genéticas, con gran rapidez.

En esta especie, los modelos transgénicos se obtienen generalmente inyectando en los embriones de mosca una construcción que consta de un promotor activable mediante la unión del transactivador GAL4 (UAS), seguido del exón 1 de la htt humana o la proteína completa con una expansión de poliQ patogénica (37 CAG o más). Esta mosca, por si sola, no expresa la construcción ya que tiene que estar presente el transactivador GAL 4 para que se produzca su transcripción; pero si cruzamos esta cepa con otra cepa que exprese dicho transactivador (GAL 4), entonces éste se unirá al UAS y obtendremos la expresión del transgen. Existen cepas estándar que expresan GAL 4 en tejidos específicos, por lo que al cruzarlas con la cepa que lleva el transgen de la htt mutada (htt*) obtendremos una expresión de éste específica del tejido que queramos (40). La cepa resultante expresará dos copias de htt endógena no mutada y la construcción que nosotros hemos introducido de htt* en el tejido específico que quera-

mos. La expresión de la htt* en *Drosophila* reproduce la degeneración neuronal tardía (comienza en el estado de larva madura/pupa) característica de la EH en humanos (41). La severidad de la enfermedad, al igual que en humanos, es progresiva, dependiente de la longitud de la poliQ, y causa déficit motor y muerte neuronal temprana (41). Las poliQs expandidas hacen que la localización citoplásmica de la htt que se de con longitudes de poliQ no patogénicas pase a ser nuclear, y que comiencen a aparecer agregados nucleares (25).

Este modelo es muy útil para investigar tanto los mecanismos de actuación de la EH, como el desarrollo de tratamientos y curas. Entre los fármacos que se han estudiado en este modelo se encuentra inhibidores de histonadeacetilasas (42), péptidos inhibidores de la agregación (43-45) y drogas que modifican la respuesta celular al estrés (46). También se han realizado screennings genéticos en busca de posibles moléculas que intervengan en la EH y que ofrezcan una pista sobre las posibles rutas afectadas.

3. ROEDORES COMO MODELOS DE EH

El *Mus musculus* es la especie más frecuente de ratón utilizada en los laboratorios de investigación. En general, los roedores se vienen utilizando como modelo de la EH desde hace más de tres décadas. Estos animales reúnen una serie de características de crianza y manipulación genética que los convierten en buenos candidatos a ser modelos de estudio de enfermedades:

- 1. Tamaño apropiado para la crianza y manipulación
- Poseen un breve período de gestación (19-21 días) con un alto número de crías y rápido destete. Esto supone una rápida generación de animales para el estudio.
- 3. La duración de su vida es de 3 años aproximadamente, lo que supone que en un periodo de tiempo relativamente corto puedes analizar todo el desarrollo de la enfermedad, tanto de estadios presintomáticos como sintomáticos.
- 4. Al ser mamíferos euterios, al igual que el hombre, tienen un genoma muy similar a los humanos por lo que poseen genes ortólogos para la mayoría de las enfermedades humanas.
- La manipulación de sus genes por medio de técnicas de ingeniería genética es relativamente fácil, permitiendo crear variaciones y combinaciones con rapidez y facilidad.

- 6. Se pueden cruzar fácilmente con otros modelos animales y, gracias al breve periodo de gestación, obtener combinaciones genéticas con rapidez para poder analizar las implicaciones de otras proteínas en la EH.
- 7. Los roedores modelo de la EH se podrían clasificar en dos categorías según los métodos utilizados para generarlos: 1) modelos animales «químicamente inducidos» o 2) modelos animales «genéticos».

3.1 Modelos químicamente inducidos

3.1.1. Excitotóxicos directos

La palabra excitotoxicidad hace referencia al efecto perjudicial que tiene sobre las neuronas la administración de altas concentraciones de glutamato o de sus agonistas (tanto mediante inyección intraestriatal como sistémica). El ácido glutámico o glutamato, es un aminoácido no esencial perteneciente al grupo de los aminoácidos ácidos o con carga negativa a pH fisiológico. Es el neurotransmisor excitatorio por excelencia de la corteza cerebral humana. Su papel como neurotransmisor está mediado por la estimulación selectiva de receptores ionotrópicos (canales iónicos) y receptores metabotrópicos (de siete dominios transmembrana y acoplados a proteínas G). La razón de utilizar agonistas del glutamato para generar un modelo animal de EH es que el estriado recibe gran cantidad de aportación glutamatérgica de las neuronas aferentes corticoestriatales, por lo tanto, es una estructura con alto riesgo de lesión producida por glutamato (47).

Estos modelos animales fueron los primeros modelos en utilizarse (en la década de los 70) antes de que se identificase la mutación responsable de la EH en 1993 (17). Reproducen algunas características de la EH como hiperquinesia, capacidades motoras mermadas y déficit en aprendizaje espacial y ejecutivo. Sin embargo, no son capaces de reproducir el componente «progresivo» de la enfermedad en el empeoramiento del comportamiento (48). Las características inclusiones intranucleares de htt* observadas en humanos y otros modelos animales de EH, no se reproducen en estos modelos ya que la enfermedad no se produce por la presencia de la proteína mutada (responsable de la aparición de las mismas), sino por la adición exógena de compuestos que reproducen la lesión.

A) Ácido Quinolínico (AQ): Este modelo es el más utilizado tanto en roedores como en primates no humanos. El AQ es un metabolito endógeno del triptófano por la vía de la kinerenina y actúa como agonista del glutamato de

forma selectiva para los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). El triptófano atraviesa la barrera hematoencefálica usando transportadores que también utilizan los aminoácidos neutros [49] y, en el cerebro, es internalizado por los astrocitos, macrófagos, microglía y células dendríticas que lo convierten en kinurenina (50). En presencia de la encima 3-hidroxiantranilico oxigenasa, la kinurenina es trasnformada en AQ. Niveles normales de AQ no causan ningún daño, pero un pequeño incremento en sus niveles es tóxico. El AQ no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que hay que suministrarlo mediante invección intraestriatal (51). La administración de AQ produce la despolarización celular por influjo de corrientes de calcio intracelular y, como consecuencia, la producción de radicales libres que llevan a la muerte celular específica en el estriado de las neuronas GABAérgicas [neuronas espinosas de tamaño medio tanto encefalina positivas como sustancia P positivas (52-54)], permaneciendo intactas las neuronas NADPH-diaforasa positivas y las interneuronas colinérgicas (55, 56). El mecanismo de muerte celular que se produce en este modelo reproduce bastante bien el que se produce en los cerebros de EH (55, 57, 58). También se encuentran afectadas otras áreas del cerebro como el GP y la SN, aunque este daño en zonas remotas a la inyección no se atribuye a la toxicidad del AQ sino a la liberación por el estriado de sustancias excitotóxicas [óxido nítrico, proteína acídica fibrilar glial (GFAP)] en sus principales zonas de proyección. La inyección tanto uni- como bilateral de AQ produce un fenotipo tanto de comportamiento como neuroanatómico sutil, más similar a los síntomas tempranos de la EH que a los tardíos. La inyección unilateral provoca un comportamiento rotatorio inducido por el agonista de la dopamina apomorfina (59), así como problemas motores en las pata delanteras contralaterales al hemisferio dañado (60). A nivel cognitivo, estos ratones desarrollan alteración del aprendizaje espacial, de la memoria y de las funciones visuoperceptivas (61-63). Este modelo, al ejemplificar los síntomas de las fases iniciales de la EH, es muy útil para el estudio de fármacos neuroprotectores. En 1998 se probó en estos modelos animales un tratamiento de implantación de células encapsuladas genéticamente modificadas para secretar Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF), y se vio que mejoraban los déficit motor y cognitivo resultantes de la lesión bilateral de los animales con AQ (64). También se han realizado tratamientos con el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (compuesto producido por las neuronas corticales y secretado en el estriado, esencial para la supervivencia de las neuronas estriatales), y se ha visto que, si se les implantaban células modificadas para producir BDNF, se prevenía totalmente la pérdida de neuronas espinosas de tamaño medio que provoca la lesión con AQ (65). Además, trasplantes de células madre fetales humanas o administración de

factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) en el estriado de estos animales atenúan los déficits motores y protege a las neuronas de la degeneración que se produce el AQ (60, 66). Por último, a ratas lesionadas con AQ se les trasplantó células corticales fetales, administradas por vía intravenosa (inyección en la vena de la cola), y se vio que mejoraba el comportamiento rotacional y disminuía la atrofia del estriado (67).

B) <u>Kainato</u>: Fue la primera toxina utilizada como modelo de la EH (68). El Kainato es una pirolidina acídica aislada originariamente del alga *Digenea simples*. También actúa como agonista del glutamato pero no sobre los receptores NMDA como en el caso del AQ, sino sobre los receptores ionotrópicos en general (canales iónicos), por lo que su efecto no es tan selectivo de neuronas GABAérgicas estriatales y afecta también a las interneuronas NADPH-diaforasa positivas y a las neuronas de proyección (56, 69). Además, la inyección de kainato también produce lesiones en zonas más remotas al pinchazo y a altas concentraciones destruye las fibras de paso, razón por la que ha sido sustituido por el modelo de AQ como modelo más utilizado.

Los modelos excitotóxicos han llevado al uso de antagonistas del glutamato como tratamiento para la EH. Antagonistas del receptor NMDA como el Riluzol o la Amantidina se usan frecuentemente en pacientes de EH (70).

3.1.2. Excitotóxicos indirectos

Estos modelos no se producen por la inyección de compuestos agonistas del glutamato, sino por la administración de toxinas mitocondriales. Estas toxinas producen un aumento en la formación de lactato, una depleción en la cantidad de adenosin-trifosfato (ATP) y degeneración neuronal específica de las neuronas GABAérgicas debido a la disrupción del metabolismo energético de la mitocondria. El efecto indirecto de estos cambios es excitotoxicidad neuronal. Al igual que en los modelos excitotóxicos directos, estos animales tampoco reproducen algunos de los síntomas motores de la EH (sobre todo el carácter progresivo de la misma) y tampoco poseen agregados proteicos ya que carecen de la proteína mutada responsable de su formación. Para producir estos modelos animales se pueden utilizar distintas toxinas mitocondriales (malonato, Mn²+, MPP+, aminooxiacetato, rotenona, 3-acetil-piridina) aunque el más utilizado de todos es el ácido 3-nitropropiónico.

A) <u>Ácido 3-nitropropiónico (3-NP)</u>: El 3-nitropropanol actúa como inhibidor crónico e irreversible de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenada

del complejo respiratorio II del ciclo de Krebs, localizada en la membrana interna de la mitocondria y responsable de la oxidación de succinato a fumarato (56, 71, 72). La disrupción de la actividad mitocondrial está asociada a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales superóxido, radicales hidroxilo y peróxidos de hidrógeno que dañan la membrana celular y el ADN (73). Este proceso de muerte celular por mal funcionamiento mitocondrial también se produce en el cerebro de pacientes con EH como consecuencia del mal funcionamiento del metabolismo de la glucosa. Además, en el caudado y putamen de cerebros de pacientes de EH se han encontrado deficiencia en algunas enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena transportadora de electrones, así como una reducción en la actividad de la aconitasa y de los complejos II, III y IV (73-75).

Los efectos del 3-NP se descubrieron cuando, en China, unos niños ingirieron azúcar de caña infectada con el hongo Arthrinium cuyo metabolismo produce 3-NP (76, 77), y que les produjo muerte celular en el caudado y putamen y distonía severa (78). El 3-NP cruza la barrera hematoencefálica por lo que la forma de administración del 3-NP es mediante una o varias inyecciones subcutáneas. Aunque la administración del 3-NP sea sistémica, produce una degeneración selectiva bilateral en la zona dorso-lateral del estriado (79, 80) que recuerda la patología severa que se ve en el putamen dorsolateral en las cerebros de EH (12). Si las dosis son a altas concentraciones y se administran en un periodo de tiempo corto (1-5 días), no se replica la patología de EH ya que se produce una depleción total de neuronas en el área central de la invección estriatal y sólo existe una pequeña zona de transición entre el centro de la lesión y el resto del tejido estriatal normal. La similitud con la EH sólo se consigue con la administración de forma crónica (1 mes aproximadamente) de dosis bajas de este compuesto (10-12 mg/kg·d) (79, 81). Con este protocolo se consigue reproducir los movimientos hipoquinéticos así como el déficit en memoria de trabajo y atención más similares a los síntomas tempranos de la EH (82, 83). La pérdida neuronal es difusa incrementando desde la zona no afectada del estriado hacia el centro de la lesión. En el centro de la lesión se observa pérdida de las neuronas GABAérgicas dejando relativamente intactas las neuronas NADPH-diaforasa positivas y las neuronas aferentes dopaminérgicas, acompañada de astrogliosis moderada y disminución en la actividad citocromo oxidasa (79, 84, 85).

Aunque este modelo replica bastante bien algunas de las características de la EH, tiene algunas limitaciones. El repertorio de movimientos anormales no se asemeja demasiado a los experimentados por los pacientes de la EH ya que, al ser la organización de los ganglios basales distinta en roedores que

en primates, algunos movimientos anormales que se producen como resultado de esta diferente estructuración (movimientos coreicos, hiperlocomotores, distonía y bradiquinesia) no se pueden reproducir en este modelo animal (83, 84). Además este modelo es muy heterogéneo en cuanto a las lesiones producidas. Sólo en la mitad de los casos se producen lesiones estriatales, el resto de las veces se producen lesiones extraestriatales en estructuras como el GP, el hipocampo, el tálamo o la SN *pars reticulata* (79, 84). Por último, distintas cepas de ratones responden de forma muy diferente a la inyección de 3-NP, por lo que no es un modelo adecuado para el estudio de fármacos neuroprotectores en los que se requiera una distribución homogénea y consistente del neurotóxico (84).

A pesar de sus limitaciones, este modelo está especialmente recomendado para el estudio de tratamientos principalmente motores de la EH en los que se pretende hacer una evaluación final para medir la eficacia, así como para el estudio de la fisiopatología mitocondrial de la EH (86). Un ejemplo son los estudios realizados mediante la expresión génica de GDNF o neurturina, sustancias que protegen las neuronas positivas para sustancia P (87) o que contienen encefalina (88) respectivamente, mediante virus adeno-asociados (AAV), donde se vio que protegían contra la degeneración de las neuronas estriatales y prevenían el déficit motor (89).

El uso de estos modelos animales producidos por toxinas mitocondriales ha llevado al uso de protectores mitocondriales como la coenzima Q10 (molécula presente en la cadena transportadora de electrones que se encarga del transporte de electrones de los complejos I y II al complejo III) (90) y la creatina (compuesto capaz de tamponar los niveles de ATP en la célula) como tratamiento para la EH.

De todo lo descrito anteriormente se deduce que, aunque los modelos excitotóxicos, tanto directos como indirectos, representan una herramienta muy útil para estudiar algunos aspectos de la enfermedad. No son un modelo perfecto ya que no poseen la proteína causante de la enfermedad, la htt*. Todavía no se ha llegado a un acuerdo sobre si la formación de inclusiones en la EH es beneficioso o perjudicial, pero sí que están establecidas como marca histopatológica de la EH por lo que un buen modelo debería replicarlas. Ya se ha descrito que estos modelos animales no reproducen el carácter progresivo de la enfermedad ya que la muerte neuronal que se produce no es un periodo lento y posiblemente secundario a otros procesos que tengan lugar en la célula como pasa en la EH, sino que es un proceso inmediato y consecuencia principal de la toxina suministrada.

3.2. Modelos genéticos

Desde el descubrimiento de la mutación que da lugar a la EH en 1993 (17), comenzaron a proliferar los modelos genéticos de esta enfermedad. Estos modelos intentan reproducir fielmente el desarrollo de la EH, y para ello se realiza algún tipo de modificación en el gen de la proteína htt responsable de la EH y se introduce en los genes de la línea germinal del ratón, de esta forma el ratón desarrollará la patología. Estos modelos permiten identificar las primeras manifestaciones de la EH así como seguir a lo largo del tiempo la degeneración neuropatológica, electrofisiológica y del comportamiento que sufren estos ratones. Las técnicas genéticas utilizadas para la creación de estos modelos animales de la EH son diversas, teniendo cada una de ellas sus ventajas y desventajas.

3.2.1. Modelos genéticos con la proteína htt endógena modificada

A) Modelos genéticos Knock-out: Se generan eliminando el gen ortólogo murino de la proteína htt dando lugar a un ratón carente de la misma (Figura 1). En un principio se creía que la EH se producía por una pérdida de función de la proteína htt debida a la poliQ, pero al generar ratones knock-out para esta proteína (91, 92) se vio que su carencia era incompatible con la vida va que se producía letalidad embrionaria antes del día 8.5 de gestación (antes de la gastrulación y la formación del sistema nervioso central) (93-95). Sin embargo, ratones en los que la carencia de esta proteína estaba en heterocigosis en vez de en homocigosis, es decir, tenían un único alelo completo funcional (50% del contenido normal de htt) sí eran compatibles con la vida (2). Además, si estos ratones se cruzaban con ratones transgénico para la htt de forma que no expresasen la proteína endógena pero si un alelo de htt*, no se producía letalidad embrionaria. La htt* es capaz de rescatar el fenotipo de letalidad del ratón knock-out y no se desarrollaba EH (96). En base a los resultados obtenidos se vio que estos ratones no eran buenos modelos para la EH, pero pusieron de manifiesto la implicación de la htt en el desarrollo embrionario además de la implicación de la ganancia de función tóxica en la EH (97). También se han estudiado ratones a los que se les ha eliminado las 7 repeticiones de CAG que posee el gen de la htt murina para saber cual era su aportación a la patología de EH (98). Este ratón nacía con frecuencia mendeliana y no presentaba un fenotipo característico de la EH. A edad adulta tampoco presentaban signos evidentes de enfermedad excepto por un ligero défi-

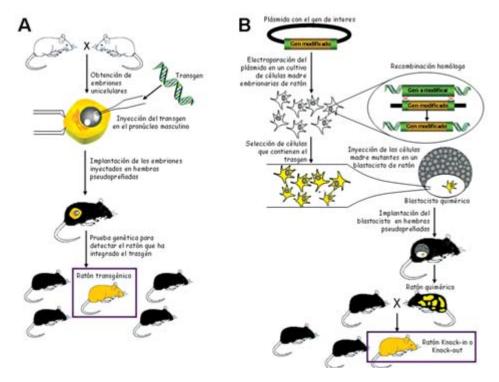


Figura 1. Esquema de la generación de animales transgénicos y knock-in / knock-out. A. Generación de animales transgénicos mediante la implantación de embriones, a los que se les ha inyectado el transgén de interés en el pronúcleo masculino, en hembras pseudopreñadas. B. Generación de animales knock-in o knock-out mediante implantación, en hembras pseudopreñadas, de un blastocisto al que se le ha inyectado previamente células madre mutantes que han integrado el gen de interés mediante recombinación homóloga.

cit de memoria. Esto nos dice que la región de la poliQ no es necesaria para la función que desarrolla la htt durante el desarrollo embrionario y que posiblemente tampoco se requiera para una función esencial de la htt sino más bien para modular su función normal.

También existe un modelo knock-out condicional de la EH (99) en el que se ha utilizado la estrategia Cre/loxP de recombinación específica bajo el promotor de la CamKII· para inhibir postnatalmente la expresión de htt en cerebro y testículos, dando lugar a déficit en el comportamiento y a un proceso degenerativo neuronal progresivo similar al desarrollado en otros modelos transgénicos de la EH. Este modelo nos ha permitido corroborar que la htt es importante para la función y supervivencia neuronal y que, aunque la pérdida de

función de la htt no es la responsable de la EH, si que puede contribuir a la patogénesis de la EH.

B) Modelos genéticos Knock-in: Estos modelos son los que representan más fielmente la EH humana ya que se obtienen al introducir la mutación causante de la EH (la expansión de poliQ) dentro del propio gen ortólogo murino de la htt en la posición exacta que debería ir si la mutación se diese de forma natural (Figura 1). El resultado es que estos ratones tienen dos copias de la proteína htt ambas modificadas (homocigotos) o sólo una de ellas (heterocigotos), ambas bajo la dirección del promotor endógeno de la htt. Existen varios tipos de modelos knock-in con expansiones de poliQ que van desde 50 (96) hasta 150 repeticiones (100). De la misma forma que en los pacientes de EH, existe el fenómeno de anticipación génica o inestabilidad (aumento de la longitud de la repetición de generación en generación), este modelo de la EH también presenta inestabilidad, relacionada con la edad, de la poliQ en neuronas. Esta inestabilidad no se da en todas las regiones, sino que es específica de algunas, encontrándose los mayores aumentos en la longitud de la poliQ en el estriado y la corteza (101). Está ampliamente demostrado que existe una relación directamente proporcional entre la longitud de la poliQ y la patogenicidad de la misma (22), por lo que, la confirmación de que la mayor inestabilidad se de principalmente en estriado y corteza, que son la áreas más afectadas en la EH, podría dar respuesta a la característica pérdida selectiva de neuronas en estas regiones en la EH (102, 103). Los ratones knock-in homocigotos desarrollan déficit en el comportamiento a muy temprana edad, anteriores incluso a la neuropatología. Además, aunque no existen signos claros de degeneración estriatal, si que existe patología estriatal. A edades muy tempranas, la htt se transloca al núcleo dando un patrón de tinción difuso y comienzan a aparecer microagregados nucleares de htt (2-6 meses dependiendo del modelo) (100, 104-106) aunque las inclusiones no se detectan hasta edades mucho más tardías (10-18 meses dependiendo del modelo) (100, 105). En los modelos con un número menor de repeticiones (94 CAG) la tinción nuclear y los agregados se ven restringidos al estriado, mientras que en ratones con un número mayor de repeticiones (140 CAG) éstos se encuentran más ampliamente distribuidos y comienzan a aparecer agregados citoplásmicos (107). Estos resultados en la progresión del desarrollo de agregados es importante ya que nos muestra que no contribuye a los déficits en comportamiento iniciales, por lo que no son una buena diana terapéutica para estadios tempranos; sin embrago, si pueden contribuir a los déficits funcionales que tienen lugar en los estadios más tardíos de la enfermedad. En alguno

de estos modelos se han visto alteraciones moleculares (disminución de los niveles de mRNA de la encefalina en el estriado) (108) y celulares (aumento en la sensibilidad a glutamato) (109), pero ninguno sufre, incluso a edades muy avanzadas, muerte neuronal o gliosis (100). Estos resultados nos dicen que la disfunción neuronal es un proceso que precede a la muerte neuronal, así que ésta podría considerarse consecuencia de la disfunción y no al contrario. Además correlaciona con el hecho de que existan déficit motores sutiles bastantes años antes a la aparición de otros síntomas y de atrofia en pacientes de EH (110).

A pesar de ser genéticamente el mejor modelo para la EH, el lento desarrollo del fenotipo motor hace que no sea un modelo muy utilizado para la caracterización de la patología. Además también resulta bastante difícil la caracterización de los efectos terapéuticos de fármacos y tratamientos, por lo que no se utilizan mucho como modelo para probarlos.

3.2.2. Modelos genéticos transgénicos

En los modelos transgénicos, como ya se ha explicado en modelos anteriores, se inserta al azar en el genoma del ratón el gen de la htt* humana, o parte de ella bajo, la dirección de diferentes promotores que pueden restringir la expresión a zonas determinadas del cerebro (Figura 1). Estos ratones expresarán dos copias normales de htt murina y una copia (ya sea la proteína completa o una forma truncada) de htt* humana. Los animales pertenecientes a esta categoría también pueden clasificarse en dos grupos dependiendo de la longitud del fragmento de la htt introducido en el genoma del ratón:

A) Ratones a los que se les ha insertado un fragmento de la proteína htt: Normalmente se inserta un fragmento correspondiente al exón 1 o a los 2 primeros exones de la htt con la expansión de poliQ en su extremo N-terminal. De esta forma, estos ratones expresan sus dos copias endógenas normales de la htt más el fragmento patogénico insertado. Algunos de los modelos de ratones pertenecientes a este grupo más utilizados son (Tabla1):

R6/1 y R6/2: Son los modelos más utilizados. Estos ratones contienen insertado al azar en su genoma el exón 1 de la htt humana con 116 y 144 repeticiones de CAG respectivamente que se expresa de forma ubicua bajo el promotor de la htt humana (111). El alto número de repeticiones de CAG que contienen hace que la manifestación de la EH se corresponda con la forma juvenil de la enfermedad, teniendo un fenotipo muy agresivo y de

rápida evolución, aunque, los cambios estructurales que se producen en el estriado se asemejan más a la patología de inicio adulto. Estos ratones sufren una reducción progresiva del peso corporal (al final de su vida pesan un 70% menos que los no transgénicos (111)), pérdida de volumen y peso del cerebro (comienza a los días postnatales 30 y 60 respectivamente), disminución del volumen del estriado (por pérdida de neuronas estriatales que tiene lugar a los 90 días de edad (112)), y declive cognitivo y motor (temblor, corea, movimientos estereotípicos y distonía (111, 112)). En los R6/2 la edad media de aparición de los síntomas motores es de 9 a 11 semanas y la edad media de muerte es a las 10 a 13 semanas. En los R6/1 el fenotipo empieza más tarde, a las 22 semanas y la vida media es más larga que en los R6/2. La pérdida neuronal que se produce se da en las neuronas que expresan encefalina (a las 6 semanas) pero no en las que expresan sustancia P (113) y no es ni apoptótica ni necrótica, sino del tipo «dark neurons» que también se ha descrito en los pacientes de EH (Turmaine 2000). Aunque el alto número de repeticiones de CAG de estos ratones hace que su patología se parezca más al fenotipo juvenil que al adulto. Además, las proyecciones de las neuronas que expresan encefalina hacia el GP degeneran, mientras que las de las neuronas que expresan sustancia P no lo hacen. Antes del inicio de los síntomas (al menos 1 mes antes) se produce la pérdida de diferentes receptores de neurotransmisores, de forma similar a lo que sucede en pacientes adultos de EH, como son el receptor metabotrópico tipo 1 del glutamato, los receptores D1 y D2 de dopamina y los receptores colinérgicos muscarínicos (114). Además, también reproducen las inclusiones propias de la EH antes del inicio de los síntomas, comenzando en la corteza y el hipocampo (CA1 antes que en CA3), y progresando después hacia el estriado.

N-171-82Q: Este modelo contiene un fragmento más largo de la proteína htt que el que llevan los R6, lleva los exones 1 y 2 (171 primeros aminoácidos) con 82 repeticiones de poliQ bajo el control del promotor de la proteína del prion murino por lo que la expresión se da en todo el cerebro pero restringida a neuronas (115). Por lo tanto, este ratón tiene 2 copias de la proteína htt murina y un fragmento de la htt* mutada. Al tener un número de repeticiones menor que los R6, el fenotipo es más suave, aunque también más variable que en los R6 y comienza más tarde. Las características neuropatológicas de estos animales son más similares a las de la EH humana. El fenotipo motor comienza a los 2,5 meses de vida y cursa con temblor, hipoquinesia, y «clasping» tanto de las extremidades anteriores como posteriores. Con respecto al declive cognitivo, muestran déficits en la memoria de trabajo a las

José J. Lucas y Zaira Ortega

Fabla 1. Resumen de las principales características de los modelos genéticos transgénicos de ratón: En esta tabla se describe: el fondo genético del ratón; el contenido en htt siendo IX el nivel normal de htt en los ratones; el lleva la construcción que se ha introducido en el ratón; el tamaño del fragmento de htt que se ha introducido en el ratón expresado en exones o aminoácidos (aa) y el número de repeticiones de CAG que lleva el fragmento de htt introducido; el enotipo que desarrollan los animales expresado en días (d) o meses (m); las distintas estructuras en las que aparecen inclusiones (st=estriado, cx=corteza, hipp=hipocampo, cb=cerebelo); las zonas en las que se produce muerte neuronal; y las zonas en las que se produce atrofia.

	Atrofia del cerebro	Todo el cerebro.	Todo el cerebro.	Todo el cerebro Estriatal progresiva.	
Towns and the second of the se	Muerte neuronal	Corteza frontal, estriado dorsal y cerebelo.	Estriado lateral.	Estriado (17m).	Muerte en st.
	Inclusiones	De neuropilo en dendritas y espinas en Cx, hipp y st.	En st, cx, hipp, amígdala, cb. Tinción difusa nuclear.	Inclusiones en st, septum, cx, hipp.	Inclusiones en st.
	Fenotipo	Déficit en rotarod (40d). Clasping, temblor, corea, distonía, dificultad al tragar, hipoquinesia, narcolepsia, pérdida de peso (2m).	Clasping y déficit en rotarod (2,5m) Temblores, dificultad al tragar, hipoquinesia, pérdida de peso, Muerte temprana	Clasping a los 2,5m Déficit en rotarod a partir de 2,5m Temblor, dificultad al tragar	Clasping (3m). Ataxia hiperactividad y comportamiento rotatorio (3m) ipoquinesia (6m). Pérdida de peso, movimientos rotatorios, dificultad al tragar, ataxia (12m).
	Tamaño del trasgen/ repeticiones de CAG	Exon1 / 116Q-144Q	171 aa / 820, 440, 180	Exon1/94Q	Ht completa/72Q, 128Q
	Promotor	Huntingtina humana	Proteína del prion murino	CamKIIo- tTA	Huntingtina humana
	Contenido en htt	ARN <1X	De 1/5X a 1/10X	> endógena	2X
	Fondo genético	CBA/C57B16	C3H/B16	CBA/C57B16	FVB/N
	Animal	R6/1-R6/2 (111)	N171-82Q (115)	HD94 (117)	YAC (121)

14 semanas (116). Presentan una pérdida neuronal en el estriado del 25% a las 16 semanas, acompañado de inclusiones en el estriado, la corteza y el hipocampo. Es un modelo muy utilizado par el estudio de terapias presintomáticas y paliativas.

HD94: Modelo inducible: En este ratón, la expresión del exón 1 de la htt con 94 repeticiones de CAG está bajo el control de un promotor represible mediante tetraciclina (117). Este promotor necesita la unión de un transactivador para su funcionamiento. Este transactivador se encuentra bajo el promotor de la Calcio-calmodulina quinasa II y hace que la expresión del transgén se limite a cerebro anterior. La administración de tetraciclina (u homologos como la doxiciclina) hace que ésta se una al transactivador impidiendo su unión al promotor e inhibiendo así la transcripción de la htt*. Este ratón presenta un fenotipo motor que, además, reproduce el componente progresivo de la EH ya que empeora con la edad. Se han realizado múltiples estudios con este ratón, entre ellos, estudios de reversión tanto de los agregados característicos de la enfermedad, como del fenotipo motor. Estudios en cultivos primarios de neuronas estriatales obtenidas de estos ratones revelaron que son necesarios tan sólo 2 días de expresión del trasgén para que se produzca la aparición de agregados y que, si interrumpes el influjo de proteína mutada, 5 días son suficientes para que desaparezcan (118). Además, la presencia de agregados no compromete la viabilidad del cultivo, dato a favor de que no son los agregados las especies patogénicas en la EH (118). Estos resultados, que apuntan hacia la reversibilidad de la patología, también se han podido reproducir in vivo en este modelo animal. Cuando a animales que ya presentan signos evidentes de la patología (síntomas motores, agregados nucleares y citoplásmicos y reducción del volumen del estriado del 25%) se les interrumpe el aporte de htt*, las inclusiones tanto nucleares como citoplásmicas desaparecen, mejora el fenotipo motor, disminuye el número de astrocitos reactivos y se previene la atrofia estriatal (117). Además, cuando se hace un análisis más exhaustivo del comportamiento de los agregados ante la reversión, se ve que éstos no se disgregan en las fibrillas que los componen, sino que también estas fibrillas se disgregan en sus componentes (119). Todos estos estudios se han realizado a edades en las que se había producido una disminución en el volumen del estriado (del 25%) pero todavía no había muerte neuronal (117, 119). Cuando se realizan estos mismos experimentos a edades mucho más avanzadas en las que ya se ha producido muerte neuronal, sorprendentemente se obtienen los mismos resultados: disminución en el número de agregados y recuperación motora completa. La muerte neuronal que se produce en el estriado no revierte, pero se evita su progresión permaneciendo estancada desde el momento en el que se elimina el aporte de htt* (120). Todos estos resultados apuntan hacia la posibilidad de utilizar terapias de silenciamiento del gen de la htt como posibles tratamientos en estadios tardíos de la EH.

B) Ratones a los que se les ha insertado la proteína htt completa: Estos ratones expresarán sus dos copias de htt murina normal y una copia de htt*. Los más utilizados son:

<u>YAC</u>: Estos ratones se generaron utilizando como vectores los cromosomas artificiales de levaduras (YAC) en los que se insertó el gen completo de la htt (IT15) con expansiones patogénicas de poliQ bajo el control del promotor de la htt humana (121). Existen dos cepas distintas, una que expresa 72 repeticiones de CAG y otra que expresa 128 repeticiones. Ambas cepas muestran pérdida neuronal en el estriado (122) y tinción nuclear para la htt, aunque sólo la cepa de 128 repeticiones presenta inclusiones a los 18 meses. Los ratones con 72 repeticiones de CAG desarrollan comportamiento rotatorio, ataxia y clasping en las patas traseras. Los ratones con 128 repeticiones muestran hiperquinesia a los 3 meses que va disminuyendo hasta convertirse en hipoquinesia a los 6 meses, y déficit en el aprendizaje de nuevas tareas (123). Al tener una vida media más larga que los ratones R6, son buenos candidatos para el estudio de terapias a largo plazo.

Modelo inducible: Este modelo de ratón expresa la proteína htt completa con 148 repeticiones de CAG bajo el control de un promotor regulado por tetraciclina (124). La expresión de la tetraciclina está bajo el control del promotor de la proteína del prion por lo que se expresa en todo el cerebro (124). La vida media de estos ratones es de 8-11 meses y presenta anormalidades motoras como movimientos involuntarios, ataxia, temblor, falta de coordinación y pérdida de peso. Además, presentan agregados nucleares formados por un fragmento de 60 Kd (procedente del corte proteolítico de la htt en su extremo Nterminal) en la corteza, el estriado, el hipocampo, el cerebelo y el tronco encefálico, en mayor número que los pacientes de EH. Es un modelo muy bueno para el estudio de dianas terapéuticas de la EH.

La principal diferencia entre los ratones que expresan sólo una parte de la htt y los ratones que expresan la proteína completa es la relativa falta de muerte celular en el estriado de los primeros acompañada de un aumento en GFAP característica de la astrogliosis y el aumento ventricular. La neuropatología de los ratones que expresan la proteína completa es más similar a la de los pacientes de EH que la de los ratones que sólo expresan una parte de la htt. Sin embargo los ratones que expresan el extremo N-terminal de la htt tienen un fenotipo mucho más obvio que los otros por lo que es más útil para el estudio de la

EH. Ninguno de estos modelos reproduce la pérdida de casi el 95% de las neuronas espinosas de tamaño medio que se produce en los pacientes de EH (124).

3.2.3. Modelos genéticos Víricos

Este método consiste en infectar, mediante inyección intraestriatal, las neuronas adultas con virus que llevan incluido en su genoma el gen completo o partes del gen de la proteína htt. Es un método bastante selectivo que produce degeneración del estriado por muerte de las neuronas GABAérgicas, mientras que las neuronas colin-acetiltransferasa positivas y las interneuronas NADPH-d positivas, al igual que en la patología humana, no se ven afectadas (125, 126). Actualmente se utilizan dos tipos de vectores: adenoasociados y lentivirus. Ambos virus se integran en el genoma de la célula hospedadora sin embargo, los vectores lentivirales son formas modificadas del retrovirus HIV humano, por lo que aceptan transgenes más grandes que los virus adenoasociados y por periodos de tiempo indefinidos (127). Estos modelos animales desarrollan agregados, tanto nucleares como citoplásmicos, a los 5 días de la invección (126) de forma proporcional a la longitud de la poliQ. Cuanto mayor es la longitud de la poliQ mayor es el número de agregados (125). La severidad de la patología es proporcional a los niveles de expresión del trasgén, formándose las inclusiones nucleares cuando los niveles de expresión eran más altos, y las neuríticas cuando la expresión del transgén estaba dirigida por un promotor de expresión débil (125).

Estos modelos de la EH tiene la ventaja de que, al ser inyectados, pueden introducirse en el sitio que se desee. Es un buen modelo para el estudio del efecto de pequeñas cantidades de la proteína htt*, así como para el análisis especial y temporal de la mutación. Además, dentro de un mismo animal se puede comparar el efecto de más de un vector viral. Esto es importante ya que tanto en animales transgénicos (128) como en knock-in (102), animales genéticamente idénticos desarrollan distintas cantidades de agregados proteicos. También son útiles para obtener información a cerca del papel que juegan los agregados en la EH así como de su proceso de formación. La principal desventaja de este modelo es que la mutación pierde su contexto genético ya que el transgén es insertado al azar, por lo tanto, si este contexto genético es importante para el desarrollo de la EH, este modelo no nos servirá para analizarlo y desarrollar terapias eficaces. Además, aunque se han visto agregados en zonas distantes a la inyección (indica que existe transporte anterógrado y retrógrado del vector), la patología se da en una zona muy limitada, por lo que no se pueden apreciar efectos de la infección a partir de una determinada distancia de la inyección. Es un modelo muy utilizado para examinar comportamientos cognitivos y motores complejos.

4. OVEJAS COMO MODELOS DE LA EH

Recientemente se han generado ovejas modelo de la EH. Son ovejas trasgénicas que contienen en su genoma el gen de la htt* (129). Aunque aun no se ha publicado en revistas científicas, se sabe que el desarrollo de la histopatología es muy similar al de los humanos y se espera que cuando lleguen al estadio de la EH en el que comienza a producirse muerte celular en humanos también comience a detectarse en ellas y que se desarrolle con un patrón similar.

Algunas de las razones por las que se ha elegido la oveja como animal modelo de la EH son:

- 1. La estructura cerebral es muy similar a la de los humanos.
- 2. Su esperanza de vida es de 10-15 años, mucho mayor que la de otros animales de experimentación (como los ratones).
- 3. Su producción es mucho más barata que la de primates.

Los estudios que se están realizando en este modelo animal se centran principalmente en el análisis del cerebro a edades presintomáticas. Al tener una esperanza de vida tan larga, se dispone de un gran periodo de tiempo para tratar de esclarecer los procesos que tienen lugar en la EH antes de que aparezcan los primeros síntomas. Además, también se están utilizando para probar fármacos que potencialmente pueden alterar el inicio de los síntomas. Al ser tan reciente la generación de este modelo animal, todavía no existen resultados concluyentes, pero es una herramienta muy útil que puede dar resultados interesantes en el futuro.

5. PRIMATES COMO MODELOS DE LA EH

El uso de primates como modelo de la EH supone, al igual que la oveja, un gran avance. Estos animales tienen el estriado dividido en dos estructuras, el núcleo caudado y el putamen, al igual que los humanos, mientras que los ratones no tienen esta división. Gracias a esto, el repertorio motor es más parecido al de los pacientes de EH y monitorizarán mejor los procesos que tienen lugar en el cerebro de los pacientes de EH que la mayoría de los modelos animales descritos hasta el momento. Al igual que en los modelos de ratón, en los primates

también existen distintos tipos de modelos dependiendo de la técnica utilizada para su generación:

5.1. Modelos químicamente inducidos

Hasta hace poco tiempo, todos los modelos de EH que se generaban en primates no-humanos eran modelos químicamente inducidos que se conseguían mediante inyección intraestriatal del compuesto. Los compuestos más utilizados, al igual que en los modelos de ratones, son el agonista del glutamato el AQ, y la toxina mitocondrial 3-NP.

5.1.1. Modelo excitotóxico directo: Ácido quinolínico (AQ)

Se generan mediante la invección intraestriatal uni- o bilateral del AQ. El modelo más utilizado es la lesión unilateral en contraposición con los ratones donde se realizan tanto lesiones uni- como bilaterales. Los primates que reciben lesión en el putamen pero no en el caudado presentan disfunción motora en el dominio de las extremidades superiores contralaterales al hemisferio inyectado, así como movimientos rotatorios inducidos por apomorfina (130). Lesiones unilaterales producidas en la parte posterior del putamen provoca distonía y disquinesias después de la administración de apomorfina (131). Lesiones bilaterales en la parte posterior del putamen causa síntomas similares a la corea 48 horas después de la lesión. En cuanto a las deficiencias cognitivas, las lesiones bilaterales, tanto en el caudado como en el putamen, causan déficits en la memoria (132), en la planificación de tareas (133) y déficit visuoespacial (134). Todos los síntomas, tanto en inyecciones unilaterales como bilaterales, son muy similares a los que sufren los pacientes de EH, por lo que este modelo es muy interesante para el estudio de la enfermedad. Al igual que sucedía en los modelos de ratón, este modelo no presenta agregados ya que carece de la proteína mutada; la enfermedad se produce por la acción de un compuesto químico, no por la presencia de la mutación que causa la EH en humanos. Esto supone una limitación del modelo para el estudio del desarrollo de la enfermedad, pero es un modelo muy útil para el estudio de fármacos neuroprotectivos. Gracias a él se han demostrado los beneficios de la acción de los factores tróficos en el sitio de la lesión ya que previenen la muerte celular, preservan los circuitos estriato-palidal y estriato-nigral y la atrofia en la capa V de las neuronas corticales (135).

5.1.2. *Modelo excitotóxico indirecto: Ácido 3-nitropropiónico (3-NP)*

El mecanismo de actuación del 3-NP en primates es el mismo que en ratones, así como el método de administración. En el modelo equivalente de ratón hemos mencionado que no se reproducía tanto el componente «progresivo» de la enfermedad, como algunos movimientos característicos de la misma (disquinesia, distonía, bradiquinesia). La ventaja de este modelo frente al modelo de ratón es que éste si que muestra el carácter progresivo de la EH y que, tras tratamientos prolongados de administración de 3-NP (3 meses), los animales padecen disquinesia y distonía espontánea (136). La administración de dosis bajas de 3-NP durante 3-6 semanas causan movimientos similares a la corea (cuando se les administra apomorfina) (137). Cuando este tratamiento se prolonga hasta 4 meses se produce disquinesia y distonía de forma espontánea (138). En estadios más avanzados de la EH en este modelo animal se produce déficit en la memoria (137).

Estos modelos animales son buenos para utilizar técnicas de neuroimagen, para monitorizar la evolución de la enfermedad. Además, debido a su similitud con el cerebro humano, es buen modelo para el estudio de fármacos en fase preclínica (139).

5.2. Modelos genéticos

Recientemente se ha desarrollado un modelo genético de EH en primates no humanos (140). Este modelo se ha generado inyectado lentivirus que expresan el exón 1 de la htt humana con 84 repeticiones de CAG bajo el control del promotor de la poliubiquitina-C humana, en oocitos de Macaco rhesus que posteriormente fueron fertilizados e implantados en hembras para llevar a cabo el embarazo. Los primates transgénicos obtenidos muestran una gran variabilidad en la longitud de la poliQ (desde 29 a 88 repeticiones de CAG) y el contenido de htt* (desde 1 a 4 copias). La vida media de estos primates es muy variable, variando de menos de 1 día a 6 meses, dependiendo de los niveles de htt* que expresan. Estos primates no presentan degeneración del estriado aunque si desarrollan inclusiones nucleares y agregados localizados en dendritas y axones en estriado y corteza que recuerdan a los encontrados en los cerebros de pacientes de EH y en los modelos de ratones. Entre los síntomas clínicos que muestran se encuentran movimientos involuntarios cuya severidad depende de la longitud de la poliQ y el número de copias, distonía, corea severa y problemas para tragar que se agravan según aumenta la longitud de la poliQ. Este modelo abre un amplio campo de investigación de los componentes congnitivos y comportamentales de la EH, del estudio de la patogénesis y de posibles tratamientos, así como del desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico precoz.

AGRADECIMIENTOS

Zaira Ortega ha sido beneficiaria de una beca/contrato de la Comunidad de Madrid para la realización de tesis doctoral. El equipo ha recibido financiación del Ministerio de Educación y Ciencias, de CiberNed, y de la Comunidad de Madrid y el CBM»SO» goza de financiación institucional de la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Huntington, G. (1872) On Chorea. Medical and Surgical Reporter. 26: 320-321.
- (2) Ambrose, C.M.; et al. (1994) Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 20: 27-38.
- (3) Chiu, E. and Alexander, L. (1982) Causes of death in Huntington's disease. *Med. J. Aust.* 1: 153.
- (4) HARPER, P.S. (1992) The epidemiology of Huntington's disease. Hum. Genet. 89: 365-76.
- (5) CRAUFURD, D. AND DODGE, A. (1993) Mutation size and age at onset in Huntington's disease. J. Med. Genet. 30: 1008-11.
- (6) Roos, R.A.; ET AL. (1993) Duration of illness in Huntington's disease is not related to age at onset. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 56: 98-100.
- (7) CURRIER, R.D.; JACKSON, J.F. AND MEYDRECH, E.F. (1982) Progression rate and age at onset are related in autosomal dominant neurologic diseases. *Neurology*. 32: 907-9.
- (8) FOROUD, T.; ET AL. (1999) Differences in duration of Huntington's disease based on age at onset. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 66: 52-6.
- (9) DE Boo, G.M.; ET AL. (1997) Early cognitive and motor symptoms in identified carriers of the gene for Huntington disease. *Arch. Neurol.* 54: 1353-7.
- (10) Graveland, G.A.; Williams, R.S. and DiFiglia, M. (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science*. 227: 770-3.
- (11) Heinsen, H.; et al. (1994) Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. *Acta Neuropathol.* 88: 320-33.

- (12) Vonsattel, J.P.; et al. (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44: 559-77.
- (13) Vonsattel, J.P. and DiFiglia, M. (1998) Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57: 369-84.
- (14) Berardelli, A.; et al. (1999) Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Mov. Disord.* 14: 398-403.
- (15) Paulsen, J.S., et al. (2001) Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 71: 310-4.
- (16) VAN VUGT, J.P.; ET AL. (2001) Quantitative assessment of daytime motor activity provides a responsive measure of functional decline in patients with Huntington's disease. *Mov. Disord.* 16: 481-8.
- (17) THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes, *Cell.* 72: 971-83.
- (18) Andrew, S.E., et al. (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat. Genet.* 4: 398-403.
- (19) Gusella, J.F.; et al. (1993) Molecular genetics of Huntington's disease. *Arch. Neurol.* 50: 1157-63.
- (20) Ross, C.A. (2002) Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron*. 35: 819-22.
- (21) Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 23: 217-47.
- (22) Andrew, S.E.; Goldberg, Y.P. and Hayden, M.R. (1997) Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Hum. Mol. Genet.* 6: 2005-10.
- (23) Scherzinger, E., et al.; (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell.* 90: 549-58.
- (24) GUTEKUNST, C.A.; ET AL. (1999) Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J. Neurosci.* 19: 2522-34.
- (25) DiFiglia, M.; et al. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*. 277: 1990-3.
- (26) SIERADZAN, K.A.; ET AL. (1999) Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Exp. Neurol.* 156: 92-9.
- (27) HAZEKI, N.; ET AL. (2002) Ultrastructure of nuclear aggregates formed by expressing an expanded polyglutamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 429-40.

- (28) Consortium, T.C.E.S. (1998) Genome sequence of the nematode *C elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 282: 8.
- (29) HOLBERT, S.; ET AL. (2001) The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 1811-6.
- (30) SEGALAT, L. AND NERI, C. (2003) *C. elegans* as a model for human inherited degenerative diseases. *Med. Sci. (Paris)*. 19: 1218-25.
- (31) FABER, P.W.; ET AL. (1999) Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 179-84.
- (32) PARKER, J.A.; ET AL. (2001) Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 13318-23.
- (33) ABBOTT, A. (2002) Neurologists strike gold in drug screen effort. *Nature*. 417: 109.
- (34) HEEMSKERK, J.; TOBIN, A.J. AND BAIN, L.J. (2002) Teaching old drugs new tricks. Meeting of the Neurodegeneration Drug Screening Consortium, 7-8 April 2002, Washington, DC, USA. Trends *Neurosci.* 25: 494-6.
- (35) Rubin, G.M.; ET Al. (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*. 287: 2204-15.
- (36) Reiter, L.T.; et al. (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 11: 1114-25.
- (37) Wong, A.M.; Wang, J.W. and Axel, R. (2002) Spatial representation of the glomerular map in the *Drosophila* protocerebrum. *Cell*. 109: 229-41.
- (38) Marin, E.C.; Et al. (2002) Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell.* 109: 243-55.
- (39) Rein, K.; et al. (2002) The Drosophila standard brain. Curr. Biol. 12: 227-31.
- (40) Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118: 401-15.
- (41) WARRICK, J.M.; ET AL. (1998) Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*. 93: 939-49.
- (42) Hockly, E.; Et al. (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 2041-6.
- (43) Nagai, Y.; et al. (2003) Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 12: 1253-9.

- (44) Apostol, B.L.; et al. (2003) A cell-based assay for aggregation inhibitors as therapeutics of polyglutamine-repeat disease and validation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 100: 5950-5.
- (45) KAZANTSEV, A.; ET AL. (2002) A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nat. Genet.* 30: 367-76.
- (46) Pendleton, R.G.; et al. (2002) Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 91-6.
- (47) McGeer, E.G. and McGeer, P.L. (1976) Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature*. 263: 517-9.
- (48) SANBERG, P.R. AND COYLE, J.Y. (1984) Scientific approaches to Huntington's disease. *CRC Crit. Rev. Clin. Neurobiol.* 1: 1-44.
- (49) HARGREAVES, K.M. AND PARDRIDGE, W.M. (1988) Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* 263: 19392-7.
- (50) RUDDICK, J.P.; ET AL. (2006) Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev. Mol. Med.* 8: 1-27.
- (51) Foster, A.C.; et al. (1984) Studies on the disposition of quinolinic acid after intracerebral or systemic administration in the rat. *Exp. Neurol.* 84: 428-40.
- (52) McLin, J.P., Thompson, L.M. and Steward, O. (2006) Differential susceptibility to striatal neurodegeneration induced by quinolinic acid and kainate in inbred, outbred and hybrid mouse strains. *Eur. J. Neurosci.* 24: 3134-40.
- (53) BORDELON, Y.M.; ET AL. (1997) Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J. Neurochem.* 69: 1629-39.
- (54) RIBEIRO, C.A.; ET AL. (2006) Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. *J. Neurochem.* 99: 1531-42.
- (55) ROBERTS, R.C.; ET AL. (1993) Intrastriatal injections of quinolinic acid or kainic acid: differential patterns of cell survival and the effects of data analysis on outcome. *Exp. Neurol.* 124: 274-82.
- (56) BEAL, M.F.; ET AL. (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*. 321: 168-71.
- (57) BEAL, M.F.; ET AL. (1991) Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J. Neurosci.* 11: 1649-59.
- (58) FERRANTE, R.J.; ET AL. (1993) Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp. Neurol.* 119: 46-71.

- (59) VAZEY, E.M.; ET AL. (2006) Transplanted adult neural progenitor cells survive, differentiate and reduce motor function impairment in a rodent model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 199: 384-96.
- (60) McBride, J.L.; et al. (2004) Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J. Comp. Neurol.* 475: 211-9.
- (61) Furtado, J.C. and Mazurek, M.F. (1996) Behavioral characterization of quinolinate-induced lesions of the medial striatum: relevance for Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 138: 158-68.
- (62) ISACSON, O.; ET AL. (1984) Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature*. 311: 458-60.
- (63) Francis, L.; et al. (2000) Behavior characterization of a model of Huntington's disease in rats, induced by quinolinic acid. *Rev. Neurol.* 30: 1016-21.
- (64) EMERICH, D.F.; ET AL. (1998) Cellular delivery of CNTF but not NT-4/5 prevents degeneration of striatal neurons in a rodent model of Huntington's disease. *Cell Transplant*. 7: 213-25.
- (65) PEREZ-NAVARRO, E.; ET AL. (2000) Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 75: 2190-9.
- (66) PINEDA, J.R.; ET AL. (2007) Neuroprotection by GDNF-secreting stem cells in a Huntington's disease model: optical neuroimage tracking of brain-grafted cells. *Gene Ther.* 14: 118-28.
- (67) Lee, S.T.; et al. (2005) Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington's disease rat model. *Neurosci. Res.* 52: 243-9.
- (68) COYLE, J.T. AND SCHWARCZ, R. (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*. 263: 244-6.
- (69) BEAL, M.F.; ET AL. (1985) Excitotoxin lesions do not mimic the alteration of somatostatin in Huntington's disease. *Brain Res.* 361: 135-45.
- (70) QIN, Z.H., WANG, J. AND GU, Z.L. (2005) Development of novel therapies for Huntington's disease: hope and challenge. *Acta Pharmacol. Sin.* 26: 129-42.
- (71) ALSTON, T.A.; MELA, L. AND BRIGHT, H.J. (1977) 3-Nitropropionate, the toxic substance of Indigofera, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74: 3767-71.
- (72) Coles, C.J.; Edmondson, D.E. and Singer, T.P. (1979) Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. Biol. Chem.* 254: 5161-7.
- (73) Browne, S.E.; ET AL. (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 41: 646-53.

- (74) Gu, M.; ET AL. (1996) Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* 39: 385-9.
- (75) TABRIZI, S.J.; ET AL. (1999) Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann. Neurol.* 45: 25-32.
- (76) Ming, L. (1995) Moldy sugarcane poisoning—a case report with a brief review. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 33: 363-7.
- (77) Liu, X.; Luo, X. and Hu, W. (1992) Studies on the epidemiology and etiology of moldy sugarcane poisoning in China. *Biomed. Environ. Sci.* 5: 161-77.
- (78) Ludolph, A.C.; et al. (1991) 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol. Sci.* 18: 492-8.
- (79) BEAL, M.F.; ET AL. (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 13: 4181-92.
- (80) Blum, D.; Et al. (2001) Topological analysis of striatal lesions induced by 3-nitropropionic acid in the Lewis rat. *Neuroreport*. 12: 1769-72.
- (81) Brouillet, E.; et al. (1998) Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70: 794-805.
- (82) Shear, D.A.; et al. (1998) Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 22: 1217-40.
- (83) Borlongan, C.V.; Et al. (1995) Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease. *Brain Res.* 697: 254-7.
- (84) GUYOT, M.C.; ET AL. (1997) Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience*. 79: 45-56.
- (85) Brouillet, E.; et al. (1993) Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 60: 356-9.
- (86) Brouillet, E.; et al. (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59: 427-68.
- (87) Perez-Navarro, E.; et al. (1999) Intrastriatal grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 11: 241-9.
- (88) Perez-Navarro, E.; et al. (2000) Neurturin protects striatal projection neurons but not interneurons in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience*. 98: 89-96.

- (89) McBride, J.L.; et al. (2003) Structural and functional neuroprotection in a rat model of Huntington's disease by viral gene transfer of GDNF. *Exp. Neurol*. 181: 213-23.
- (90) Kidd, P.M. (2005) Neurodegeneration from mitochondrial insufficiency: nutrients, stem cells, growth factors, and prospects for brain rebuilding using integrative management. *Altern. Med. Rev.* 10: 268-93.
- (91) Lin, B.; Et al. (1994) Sequence of the murine Huntington disease gene: evidence for conservation, alternate splicing and polymorphism in a triplet (CCG) repeat [corrected]. *Hum. Mol. Genet.* 3: 85-92.
- (92) Barnes, G.T.; Et al. (1994) Mouse Huntington's disease gene homolog (Hdh). *Somat. Cell. Mol. Genet.* 20: 87-97.
- (93) Duyao, M.P.; ET AL. (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*. 269: 407-10.
- (94) Nasir, J.; et al. (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell.* 81: 811-23.
- (95) ZEITLIN, S.; ET AL. (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat. Genet.* 11: 155-63.
- (96) White, J.K.; et al. (1997) Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat. Genet.* 17: 404-10.
- (97) CATTANEO, E.; ET AL. (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci.* 24: 182-8.
- (98) Clabough, E.B. and Zeitlin, S.O. (2006) Deletion of the triplet repeat encoding polyglutamine within the mouse Huntington's disease gene results in subtle behavioral/motor phenotypes in vivo and elevated levels of ATP with cellular senescence in vitro. *Hum. Mol. Genet.* 15: 607-23.
- (99) Dragatsis, I.; Levine, M.S. and Zeitlin, S. (2000) Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat. Genet.* 26: 300-6.
- (100) Lin, C.H.; Et al. (2001) Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10: 137-44.
- (101) WHEELER, V.C.; ET AL. (1998) Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum. Mol. Genet.* 8: 115-22.
- (102) Menalled, L.B. and Chesselet, M.F. (2002) Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 32-9.

- (103) Kennedy, L. and Shelbourne, P.F. (2000) Dramatic mutation instability in HD mouse striatum: does polyglutamine load contribute to cell-specific vulnerability in Huntington's disease? *Hum. Mol. Genet.* 9: 2539-44.
- (104) Li, H.; ET AL. (2000) Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat. Genet.* 25: 385-9.
- (105) Menalled, L.B.; et al. (2002) Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice. *J. Neurosci.* 22: 8266-76.
- (106) WHEELER, V.C.; ET AL. (2000) Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* 9: 503-13.
- (107) Menalled, L.B.; et al. (2003) Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J. Comp. Neurol.* 465: 11-26.
- (108) Menalled, L.; et al. (2000) Decrease in striatal enkephalin mRNA in mouse models of Huntington's disease. *Exp. Neurol*. 162: 328-42.
- (109) Levine, M.S.; Et al. (1999) Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* 58: 515-32.
- (110) SMITH, M.A.; BRANDT, J. AND SHADMEHR, R. (2000) Motor disorder in Huntington's disease begins as a dysfunction in error feedback control. *Nature*. 403: 544-9.
- (111) Mangiarini, L.; et al. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*. 87: 493-506.
- (112) STACK, E.C.; ET AL. (2005) Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* 490: 354-70.
- (113) Sun, Z.; ET AL. (2002) Differential changes in striatal projection neurons in R6/2 transgenic mice for Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 11: 369-85.
- (114) Cha, J.H.; Et al. (1998) Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 6480-5.
- (115) Schilling, G.; et al. (1999) Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 8: 397-407.

- (116) RAMASWAMY, S.; ZHOU, M.J.; BERRY-KRAVIS, L.; BRANDON, E.M.; HERZOG, E.P.; GASMI, C.D.; BARTUS, M. AND KORDOWER, R.T. (2004) Cognitive deficits in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. (Special issue for the American Society for Neural Therapy and Repair).
- (117) Yamamoto, A.; Lucas, J.J. and Hen, R. (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell.* 101: 57-66.
- (118) Martin-Aparicio, E.; et al. (2001) Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 21: 8772-81.
- (119) DIAZ-HERNANDEZ, M.; ET AL. (2004) Biochemical, ultrastructural, and reversibility studies on huntingtin filaments isolated from mouse and human brain. *J. Neurosci.* 24: 9361-71.
- (120) DIAZ-HERNANDEZ, M.; ET AL. (2005) Full motor recovery despite striatal neuron loss and formation of irreversible amyloid-like inclusions in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 25: 9773-81.
- (121) Hodgson, J.G.; Et al. (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neuro-degeneration. *Neuron*. 23: 181-92.
- (122) SLOW, E.J.; ET AL. (2003) Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 12: 1555-67.
- (123) Van Raamsdonk, J.M.; Et al. (2005) Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 14: 3823-35.
- (124) Tanaka, Y.; et al. (2006) Progressive phenotype and nuclear accumulation of an amino-terminal cleavage fragment in a transgenic mouse model with inducible expression of full-length mutant huntingtin. *Neurobiol. Dis.* 21: 381-91.
- (125) DE ALMEIDA, L.P.; ET AL. (2002) Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J. Neurosci.* 22: 3473-83.
- (126) Senut, M.C.; et al. (2000) Intraneuronal aggregate formation and cell death after viral expression of expanded polyglutamine tracts in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 20: 219-29.
- (127) PFEIFER, A. AND VERMA, I.M. (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2: 177-211.
- (128) Morley, J.F.; et al. (2002) The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in Caenorhabditis elegans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 10417-22.

- (129) http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/6222250.stm.
- (130) Kendall, A.L.; Hantraye, P. and Palfi, S. (2000) Striatal tissue transplantation in non-human primates. *Prog. Brain Res.* 127: 381-404.
- (131) Burns, L.H.; ET AL. (1995) Selective putaminal excitotoxic lesions in non-human primates model the movement disorder of Huntington disease. *Neuroscience*. 64: 1007-17.
- (132) BUTTERS, N.; ET AL. (1985) Memory disorders associated with Huntington's disease: verbal recall, verbal recognition and procedural memory. *Neuropsychologia*. 23: 729-43.
- (133) ROITBERG, B.Z.; ET AL. (2002) Behavioral and morphological comparison of two nonhuman primate models of Huntington's disease. *Neurosurgery*. 50: 137-45; discussion 145-6.
- (134) Mohr, E.; et al. (1991) Visuospatial cognition in Huntington's disease. *Mov. Disord.* 6: 127-32.
- (135) EMERICH, D.F.; ET AL. (1997) Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature*. 386: 395-9.
- (136) Hantraye, P.; et al. (1990) A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp. Neurol.* 108: 91-104.
- (137) Palfi, S.; et al. (1996) Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 16: 3019-25.
- (138) Brouillet, E. and Hantraye, P. (1995) Effects of chronic MPTP and 3-nitro-propionic acid in nonhuman primates. *Curr. Opin. Neurol.* 8: 469-73.
- (139) Blum, D.; Et al. (2002) Striatal and cortical neurochemical changes induced by chronic metabolic compromise in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 10: 410-26.
- (140) Yang, S.H.; ET AL. (2008) Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*. 453: 921-4.

9. Muerte neuronal mediada por la proteína *tau* a través de r eceptores muscarínicos. Implicación de *tau* en la propagación de la enfermedad de Alzheimer

ALBERTO GÓMEZ RAMOS Y JESÚS ÁVILA

RESUMEN

La patología de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer progresa a través de una ruta definida desde la región entorrinal hacia el hipocampo y desde el hipocampo a regiones corticales, según la enfermedad avanza. En este proceso, las neuronas que mueren pueden liberar su contenido al medio extracelular y este contenido ser tóxico para las neuronas vecinas contribuyendo así a la propagación de la enfermedad. En esta revisión se sugiere que la proteína tau, en forma monomérica, podría formar parte de este contenido tóxico y podría estar implicada en el progreso de la patología liberándose al medio extracelular una vez muerta la neurona e interaccionando con los receptores muscarínicos M1 y M3 de las neuronas vecinas.

Palabras clave: Propagación de la enfermedad de Alzheimer. Toxicidad de la proteína tau. Receptores muscarínicos M1 y M3.

ABSTRACT

Neuronal death mediated by tau pr otein through muscarinic receptors. Tau implication in spr eading of Alzheimer disease

Tau pathology in Alzheimer disease follows a reproducible pattern in the brain from entorhinal cortex to the hippocampus and, from the hippocampus, the

Alberto Gómez Ramos y Jesús Ávila

pathology spreads out to cortical regions, as the pathology advances. In this process, dead neurons can release their intracellular content to the extracellular space, and this content can be toxic for the surrounding neurons contributing to the spread of the pathology. In this review, it is suggested that tau protein, in monomeric form, could be a component of this toxic content and could be implicated in the spread of pathology, after neuron dead and tau protein is released to the extracellular space, by interacting of tau with M1 and M3 muscarinic receptors.

Keywords: Alzheimer disease spreading. Tau toxicity. Muscarinic receptors M1 and M3.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una demencia senil progresiva llamada así por el profesor Kraepelin en homenaje a su discípulo Alois Alzheimer quien, en 1907, fue el primero en describirla (1). A nivel histopatológico, se caracteriza por la aparición en los cerebros de los pacientes de dos estructuras aberrantes. La primera son las llamadas placas seniles. Estas estructuras tienen una localización extraneuronal y están compuestas fundamentalmente por depósitos del denominado péptido amiloide (2). La distribución de las placas seniles en los cerebros de los pacientes es difusa y variable no sólo entre regiones del cerebro, sino también entre los diferentes pacientes (3).

La segunda de estas estructuras aberrantes son los ovillos neurofibrilares (NFTs), estos se localizan fundamentalmente en el interior de las neuronas, y están compuestos en su mayor parte por la proteína asociada a microtúbulos conocida como proteína tau, que está presente en los ovillos en
forma hiperfosforilada (4, 5). En condiciones fisiológicas tau cumple funciones en las neuronas como facilitar el ensamblaje y la estabilización de
los microtúbulos. En condiciones patológicas tau se hiperfosforila, no se une
a los microtúbulos y puede autoensamblarse formando los NFT s (6). La formación de los NFT s sigue un patrón reproducible, comenzando en la corteza entorrinal y avanzando hacia regiones adyacentes como el hipocampo para
llegar finalmente hasta la corteza cerebral en los estadios más avanzados de
la enfermedad (3).

Abreviaturas: AD, Enfermedad de Alzheimer; NFTs, Ovillos neurofibrilares; 4-DAMP, 4-difenilacetoxi-1,1-dimetilpiperidinio; PKC, proteín quinasa C; PLC, fosfolipasa C; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; ACh, acetilcolina.

Uno de los objetivos en el estudio de la AD es conocer cómo se propaga la enfermedad. En esta revisión, fundamentalmente, pretendemos comentar este proceso.

DEGENERACIÓN NEURONAL Y FORMACIÓN DE NFTS

Los NFTs se van formando según una secuencia previamente descrita y que va indicando el daño en estructuras concretas del cerebro que se van produciendo durante el desarrollo de la enfermedad. Braak y Braak (3) distinguieron 6 estadios en el desarrollo y propagación de los NFT s y sugirieron una correlación entre la presencia de estas estructuras, la destrucción de regiones concretas del cerebro y la pérdida de capacidades intelectuales y cognitivas en los enfermos asociadas a estas regiones durante el desarrollo de la enfermedad (7, 8).

Los estadios I y II, a los que hacen referencia Braak y Braak (3), afectan a las regiones transentorrinales, situadas a lo lar go del borde del córtex entorrinal. Durante estas etapas el paciente no presenta síntomas aparentes de la enfermedad. Los estadios III y IV son conocidos como límbicos. En esta etapa no hay atrofia celular a nivel macroscópico, pero se ve afectada la región que comprende las cortezas entorrinal y transentorrinal, y aumenta ligeramente el número de NFT —s en el hipocampo. A lo lar go de estas etapas (I a IV) se produce un empeoramiento de las funciones cognitivas, así como cambios sutiles en la personalidad del individuo. Finalmente los estadios V y VI son conocidos como neorcorticales. En estas etapas hay un gran número de NFT s en prácticamente todas las subdivisiones del córtex cerebral y se caracterizan, histológicamente, por la destrucción de todas las áreas neocorticales de asociación. En estos estadios la demencia es evidente.

En términos generales, se ha relacionado la degeneración observada, en la región hipocampal con la pérdida de memoria que se observa en los pacientes en los primeros estadios de la enfermedad; mientras la patología de la corteza se ha relacionado con la demencia del paciente (Figura 1).

La patología de tau en Alzheimer progresa, pues, a lo lar go de una secuencia jerárquica e invariable. Comienza en una región muy concreta, la región transentorrinal y de aquí se extiende a todas las áreas del cerebro a través de una ruta que no varía. Esto explica el proceso común de deficiencia cognitiva que los pacientes sufren a lo lar go del desarrollo de la enfermedad. Sin embar go, las causas de la propagación de la enfermedad y el mecanismo de esta propagación se desconocen.

En regiones dañadas, como el hipocampo, hay una relación inversa entre el número de los denominados «ovillos fantasma» (NFT s extracelulares) y el núme-

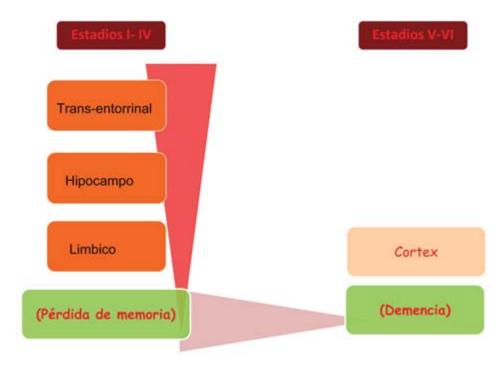


Figura 1. Esquema representativo del avance de la patología de tau en la enfermedad de Alzheimer y regiones del cerebro a las que afecta según los estadios de Braak (3). En general se asocia la degeneración neuronal en hipocampo con la pér dida de memoria y la degeneración en corteza con la demencia del paciente.

ro de neuronas vivas (9-11) lo cual sugiere que las neuronas con NFT s podrían degenerar y, una vez muertas, verter todo el contenido de su interior al medio extracelular. Esto explicaría por qué proteínas como tau pueden ser detectadas fuera de las neuronas, en el líquido cefalorraquídeo, en enfermos de Alzheimer (12).

En vista de la correlación entre la formación de agregados de tau y el desarrollo de la demencia, parece una hipótesis factible que los agregados de tau estén implicados en el proceso de neurodegeneración, sin embar go no esta claro que los NFTs sean tóxicos para las neuronas. Se ha sugerido que los agregados de tau podrían actuar secuestrando monómeros de tau y de otras proteínas que pueden ser necesarias para el correcto funcionamiento de la célula (13). Sin embar go se ha descrito que la degeneración de una neurona que contiene NFT s es muy lenta. De hecho, una neurona puede vivir décadas con estos agregados (14). Por otro lado, otros autores han demostrado en un ratón transgénico que sobreexpresaba tau, de forma inducible dando lugar a su agregación, que la simple presencia de

NFTs no es suficiente para causar deficiencias cognitivas o muerte neuronal en este modelo animal (15). En otros trabajos relacionados con otras enfermedades neurodegenerativas como la de Huntington, se ha demostrado incluso que la presencia de agregados proteicos en el interior de las células no sólo podría no ser tóxica, sino que incluso podría tener un papel protector para la célula (16).

TOXICIDAD DE LA PROTEÍNA TAU EXTRACELULAR

En base a todos estos datos nos planteamos la hipótesis de que quizás en el progreso de la AD pudieran estar implicados monómeros, o agregados, de tau presentes en el interior celular de tal forma que una vez muerta una neurona vertiera al medio extracelular su contenido. Contenido que podría ser tóxico para sus neuronas vecinas. La muerte neuronal se extendería desde la región entorrinal hasta las regiones corticales propagándose según avanza la enfermedad.

Un mecanismo de toxicidad similar se ha observado en el caso del péptido beta amiloide extracelular en forma de oligómeros. Estos agregados pueden formar poros en las membranas de células de neuroblastoma humano provocando la entrada de calcio hasta niveles tóxicos para la célula (17).

Para comprobar la posible toxicidad de tau extracelular se han realizado experimentos de viabilidad añadiendo tau en distintos niveles de agregación, (monómeros, oligómeros y polímeros) a células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. También se añadieron agregados de tau hiperfosforilado, purificados de cerebro humano y se estudió cómo la adición de diferentes formas de tau provocaban muerte celular. Nuestros primeros resultados ratificaron que, efectivamente, el tau, añadido al medio de cultivo provocaba muerte neuronal en células de neuroblastoma humano y que esta muerte aumentaba en una función de su nivel de desagregación. Cuanto más agregado se encontraba tau, menos tóxico era. De esta forma las especies mas tóxicas para las células son aquellas en las que el tau se encuentra en forma monomérica (18).

También quisimos hacer un análisis sobre la posible influencia del estado de fosforilación de tau en la toxicidad observada. Para ello añadimos al medio de cultivo tau hiperfosforilado y tau no fosforilado. En este caso observamos que el estado de fosforilación de tau también es un factor que influye levemente en su toxicidad sobre estas células neuronales, siendo más tóxico el tau menos fosforilado. Sobre este punto, cabe indicar que el estado de fosforilación en determinadas regiones de tau puede ser un factor determinante para su posterior agregación (19).

Alberto Gómez Ramos y Jesús Ávila

Posteriormente, quisimos hacer una aproximación sobre los mecanismos implicados en la muerte inducida por tau en estas células. Mediante técnicas de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra tubulina, vimos que en células tratadas con tau, el número de microtúbulos ensamblados disminuía. También observamos, en estas células tratadas, un aumento en la condensación de su cromatina, hecho que ocurre en etapas previas a la muerte celular . La aparente disminución en el número de microtúbulos ensamblados, podría ser debida a una desregulación en la homeostasis del calcio, que podría dar lugar a que determinadas quinasas dependientes de calcio, como la PKC, fosforilasen a tau en su región de unión a los microtúbulos e impidiendo su función de estabilización de los mismos (20).

Como parece que la regulación de la homeostasis del calcio se ve afectada por la exposición de las células al tau extracelular , decidimos hacer experimentos de microscopía de imagen con células car gadas con la sonda fluorescente permeable FURA-2 como indicador de la concentración intracelular de calcio. En estos experimentos se comprobó que tanto la adición de tau monomérico como en forma de oligómeros, provocan un aumento en la concentración intracelular de calcio, siendo éste más intenso y prolongado en el tiempo cuando tau está en forma monomérica. La adición de agregados de tau (NFT s) purificados de cerebro humano no produjo variaciones significativas en los niveles intracelulares de calcio con respecto a los controles. Hay , pues, una correlación entre el efecto producido por la adición de tau no polimerizado extracelular y la homeostasis del calcio en las células, provocando el tau monomérico un aumento significativo en los niveles intracelulares de calcio.

Existen varios mecanismos por los cuales los niveles de calcio intracelular pueden ser movilizados, como el flujo a través de canales de membrana o a través de receptores acoplados a canales. Para comprobar si el flujo de calcio a través de sus canales de membrana era el mecanismo por el cual el calcio intracelular aumentaba, se repitieron los experimentos anteriormente indicados en presencia de cadmio, un bloqueador no específico de canales de calcio. La adición de cadmio no tuvo influencia en las alteraciones de calcio intracelulares provocadas por tau. Otros mecanismos por los cuales los niveles intracelulares de calcio pueden aumentar, son la activación de receptores de membrana acoplados a canales de calcio, como los receptores colinér gicos nicotínicos o por la liberación de calcio del retículo endoplasmático inducida por receptores colinér gicos muscarínicos. Para comprobar si la disrupción en la homeostasis del calcio inducida por tau era mediada por alguno de estos dos tipos de receptores, se hicieron experimentos de imagen de calcio en estas células añadiendo tau en presencia de he-

xametonio (un antagonista de receptores nicotínicos) o de atropina (antagonista de receptores muscarínicos). La presencia de hexametonio no afectó al aumento de los niveles intracelulares de calcio inducidos por tau, obteniéndose unos valores similares a los controles. Sin embar go, en presencia atropina, el efecto provocado por la adición de tau se ve prácticamente anulado. Este resultado sugiere que el efecto provocado por tau es mediado por los receptores muscarínicos.

Los receptores colinérgicos muscarínicos son receptores de membrana metabotrópicos (acoplados a proteínas G) pertenecientes a la superfamilia de receptores que poseen en su estructura 7 hélices transmembrana. Se han caracterizado 5 subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) y todos ellos se expresan en el cerebro humano, aunque su localización y abundancia relativa es distinta (ver Tabla 1 (21)). Así los receptores M1 y M3 son especialmente abundantes en el hipocampo y en el cortex entorrinal en ratón (datos de Allen Brain Atlas http://www.brain-map.org/).

Tabla 1. Disribución en cerebro de los distintos subtipos de r eceptores muscarínicos, localización celular y sináptica (modificado de (21)).

Subtipo molecular	Abundancia regional	Localización celular	Localización sináptica
M1	Abundante en cerebro anterior (neocortex, neoestriado e hipocampo).	Neuronas piramidales, neuronas piramidales estriatales.	Post- >> Presináptica.
M2	Moderadamente abundante en cerebro.	Neuronas no piramidales en cortex e hipocampo.	Pre- >> Postsináptica.
M3	Bajos niveles en todo el cerebro, pero abundancia relativa en hipocampo (datos del Allen Brain Atlas*).	Neuronal.	Post- >> Presináptica.
M4	Abundante en neoestriado, niveles moderados en hipocampo y cortex.	Neuronas estriatales espinosas. Proyecciones asociacionales y comisurales del hipocampo.	Pre- >> Postsináptica.
M5	Bajos niveles en todo el cerebro.	Neuronas piramidales, substantia nigra, pars compacta, microglia.	?

^{*} http://www.brain-map.org/

Los receptores colinérgicos muscarínicos pueden, por otro lado clasificarse dos grandes clases funcionales en función del tipo de proteínas G a los cuales se unen selectivamente (Tabla 1). Así, los receptores M1, M3 y M5 se unen pre-

Alberto Gómez Ramos y Jesús Ávila

ferentemente a proteínas G de la familia G_q/G_{11} , mientras que M2 y M4 lo hacen de forma preferente a proteínas G de la familia G_q/G_0 (22). A este respecto, se sabe que la unión del ligando con los receptores M1, M3 y M5 conlleva la activación de la activación de la PLC que, en último término, lleva a la liberación de calcio intracelular del retículo endoplasmático (23).

En una segunda parte de nuestro trabajo intentamos identificar cuál era el subtipo de receptor o receptores muscarínicos implicados en el aumento de la concentración intracelular de calcio provocado por la adición de tau (24). tes de realizar los experimentos comprobamos, mediante PCR a tiempo real, si en estas células se expresaban todos los subtipos de receptores y en qué proporción. De esta forma, se comprobó que tanto M1, M2, M3, M4 y en mucha menor proporción M5, se expresan en células de neuroblastoma SH-SY5Y. Una vez comprobados los receptores muscarínicos que se expresaban en las células de neuroblastoma, quisimos hacer una primera aproximación farmacológica para ver cuál o cuáles podrían estar implicados en el efecto tóxico de tau, repitiendo los experimentos de microscopía de imagen de calcio con células SH-SY5Y cargadas con FURA-2, esta vez en presencia de antagonistas específicos de los receptores muscarínicos. Para ello, previamente al tratamiento con tau, preincubamos las células con pirenzepina (antagonista selectivo del receptor M1 (25)), galamina (antagonista de M2 (26)) y 4-DAMP (antagonista preferente de M3 (27)). Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraban que en presencia de pirenzepina y de 4-DAMP, el efecto provocado por tau se inhibía totalmente, pero la presencia de galamina no afectaba de forma significativa al aumento de la concentración intracelular inducido por tau en estas células. Parece pues, que son fundamentalmente los receptores muscarínicos M1 y M3, pero no el M2, los implicados en este efecto.

Para confirmar estos datos farmacológicos decidimos realizar experimentos adicionales de microscopía de imagen en células COS-7 transfectadas con plásmidos que contenían el cDNA de los receptores muscarínicos humanos M1 y M3 bajo el promotor adecuado para la expresión en este tipo celular . Estas células no tienen un origen neuronal y no expresan receptores muscarínicos, como comprobamos por PCR a tiempo real. El receptor M4 no fue considerado porque no se une a proteínas G_q/G_{11} y, en consecuencia, no provoca el efecto observado por la adición de tau en éstas células, y el M5 porque su expresión es extremadamente baja, tanto en estas células como fisiológicamente en hipocampo, córtex entorrinal y el cerebro en general (datos de Allen Brain Atlas http://www.brain-map.org/).

Una vez comprobada y optimizada la transfección y utilizando como control negativo células COS-7 transfectadas con el vector vacío (sin contener el

cDNA de los receptores), se realizaron los experimentos y se observó que cuando se añadía tau a las células que expresaban M1 o M3 se producía un claro aumento en la concentración intracelular de calcio, cosa que no ocurría con las células transfectadas con el vector vacío. En células cotransfectadas con ambos receptores M1 y M3, se obtuvieron resultados similares.

Tras confirmar que la activación de estos receptores mediada por tau conlleva el aumento en la concentración de calcio observado tanto en células SHSY5Y como en COS-7 transfectadas con los receptores muscarínicos M1 y M3,
quisimos conocer cuál era la región de tau implicada en esta interacción, para
ello ensayamos varios fragmentos de tau (desde el extremo amino al carboxilo)
en células COS-7 transfectadas con el receptor muscarínico M3 car gadas con
FURA-2. Nuestros resultados mostraron que principalmente el fragmento que
incluía la región central de unión a tubulina junto con la región carboxiloterminal eran los causantes de esta interacción. Haciendo un análisis más exhaustivo de este efecto, comprobamos que si añadimos solamente un pequeño péptido localizado en la región carboxilo terminal que comprende los aminoácidos
391-407, se produce un aumento en la concentración intracelular de calcio similar al provocado por la adición de tau.

Posteriormente, para hacer una aproximación más fisiológica de este fenómeno, realizamos experimentos de imagen de calcio en células de cultivos primarios embrionarios de corteza de ratón y comprobamos que los resultados obtenidos anteriormente tanto en células SH-SY5Y como en células transfectadas se repetían. Además el número de células que respondían a tau variaba en función de los días que permanezcan las células *in vitro*. Así, tras un día en cultivo responden a tau el 20% de las neuronas porcentaje que se ve incrementado cuando las células llevan 5 y 7 días, llegando a niveles de 70% en el día 7. Este aumento correlacionaba con una mayor expresión de los receptores muscarínicos.

En una última parte de nuestro trabajo, buscamos realizar una mayor caracterización de los receptores muscarínicos sensibles a tau, así como de las consecuencias derivadas de la unión de tau a estos receptores. Para ello, utilizamos células COS-7 que expresaban los receptores muscarínicos M1 y M3 y realizamos experimentos de microscopía de imagen en presencia de distintas concentraciones de ACh (utilizada como control positivo en todos los experimentos) y de tau, con objeto de hallar sus constantes de unión a los receptores muscarínicos. Nuestros resultados nos indicaron una EC50 similar (5,4.10 -8 M para ACh frente a 1,4.10 -9 M para el tau) para la interacción de tau o ACh con el receptor muscarínico M1. Resultados similares se encontraron en el caso del receptor muscarínico M3 (5.10 -9 M para la ACh, frente a 1,3.10 -10 M para el tau).

Alberto Gómez Ramos y Jesús Ávila

Por último, con objeto de demostrar una posible interacción directa entre las moléculas de tau y los receptores muscarínicos, realizamos experimentos de microscopía confocal con tau acoplado al fluoróforo Cy5 y anticuerpos que reconocían a los receptores transfectados en COS-7 con el cDNA del receptor muscarínico M1 a distintos tiempos. Se observó una colocalización de los receptores con el tau acoplado al fluoróforo. Este proceso de internalización del receptor es un efecto típico de regulación de la expresión de los receptores de acetilcolina (28) y pone en evidencia la interacción de tau con el receptor muscarínico. Cuando se repitieron los experimentos en presencia de atropina (un inhibidor de receptores muscarínicos), este efecto de internalización de tau desaparecía, sugiriendo la especificidad en esta unión.

PROPAGACIÓN, A TRAVÉS DE TAU EXTRACELULAR, DE LA PATOLOGÍA ENCONTRADA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Nuestra hipótesis es que el tau extracelular , podría actuar como transmisor de la neurodegeneración de neurona a neurona, tras una primera muerte neuronal. En la AD, el inicio de la enfermedad tiene lugar en la corteza entorrinal, observándose posteriormente la patología en la región hipocampal, en donde se encuentra el giro dentado. Más tarde, la patología se traslada a la corteza cerebral.

En la AD, de origen familiar, mutaciones en los genes app, ps1 y ps2 que codifican a las proteínas APP (proteína precursora del péptido amiloide), PS-1 (presenilina-1) y PS-2 (presenilina-2) dan lugar a la aparición de la enfermedad. Una característica común entre estas proteínas mutadas, que inducen la aparición de la AD, es que su acción en la neurona, puede tener como consecuencia la activación de la proteína quinasa GSK3, quinasa que también se conoce como tau quinasa 1, dado que esta es la quinasa capaz de modificar más residuos de la proteína tau. Para intentar tener un modelo animal que reprodujera alguna de las características patológicas encontradas en la AD, como por ejemplo la fosforilación de la proteína tau, se aisló un ratón transgénico que sobreexpresaba esta quinasa (GSK3) fundamentalmente en unas de las regiones primeramente afectadas en la AD, el giro dentado (presente en la región hipocampal). La idea inicial fue sobreexpresar la quinasa GSK3 en la corteza entorrinal, pero no se encontraron promotores que permitieran la expresión preferencial en esa zona

La sobreexpresión de la proteína quinasa GSK3 en el giro dentado da lugar a su degeneración. Curiosamente dicha degeneración se acelera en un ratón

doble transgénico que no solo sobreexpresa GSK3, sino también tau en el giro dentado. Este resultado sugiere que un exceso de la proteína tau en el espacio extracelular, consecuencia de una primera muerte neuronal, podría ser tóxico para las neuronas cercanas, dando lugar a la aceleración de la muerte neuronal. Analizando un ratón que carece de la proteína tau y que sobreexpresa GSK3 en el giro dentado, la muerte en dicha región es más lenta.

Así pues, se puede hipotetizar que en la zona de la corteza entorrinal, y posteriormente en el giro dentado, puede producirse un defecto que tenga como consecuencia la activación de la proteína quinasa GSK3. Ese defecto podría ser producido por una mutación en la proteína PS-1 (las mutaciones en PS-1 son las más prevalentes en la inducción de la AD de origen familiar). Como resultado de la activación de GSK3 se podría iniciar la muerte neuronal en dichas regiones. La muerte neuronal daría lugar a la presencia de tau extracelular y este sería tóxico para las neuronas cercanas. De este modo se iría propagando la enfermedad (Figura 1).

Otro inductor del incremento de la actividad GSK3 podría ser la presencia del péptido beta amiloide, ya que se ha descrito puede interferir con mecanismos de señalización como los inducidos por insulina o Wnt, que dan lugar a la inhibición de la actividad GSK3. En presencia del péptido amiloide, se previene el funcionamiento de estos mecanismos de señalización, dando lugar a una activación de GSK3

Por otra parte, se ha sugerido que la presencia del péptido amiloide puede ser tóxica para una neurona y que, para que este efecto tóxico tenga lugar , se requiere la presencia de la proteína tau (29).

Así pues, la hipótesis de cómo puede iniciarse y propagarse la AD de origen familiar puede partir de un incremento en la actividad de la proteína quinasa GSK3, debida a la presencia de mutaciones en la proteína APP, que facilitan la formación del péptido beta amiloide que, a su vez, promueve el incremento de la actividad de la quinasa o a mutaciones en las denominadas presenilinas, que también pueden dar lugar a una posterior activación de GSK3.

Como consecuencia del incremento de la actividad de la quinasa, se puede producir muerte celular y las proteínas presentes en el interior de la célula salen al medio extracelular , algunas de ellas pueden ser tóxicas en este medio y se propone que una de estas proteínas tóxicas, en el medio extracelular , puede ser la proteína tau.

Alberto Gómez Ramos y Jesús Ávila

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por subvenciones del Plan Nacional, del Ministerio de Sanidad, Neuropharma, Fundación M. Botín, Comunidad de Madrid y una subvención institucional para el CBMSO de la Fundación Ramón Areces.

REFERENCIAS

- (1) ALZHEIMER, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 64: 146-148.
- (2) Masters, C.L.; S imms, G.; Weinman, N.A.; M ulthaup, G.; M cDonald, B.L. y Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82: 4245-4249.
- (3) Braak, H. Y Braak, E. (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82: 239-259.
- (4) GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; QUINLAN, M.; TUNG, Y.C.; ZAIDI, M.S. Y WISNIEWS-KI, H.M. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261: 6084-6089.
- (5) GRUNDKE-IQBAL, I.; IQBAL, K.; TUNG, Y.C.; QUINLAN, M.; WISNIEWSKI, H.M. Y BINDER, L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 83: 4913-4917.
- (6) AVILA, J.; L UCAS, J.J.; P EREZ, M. Y HERNANDEZ, F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 84: 361-384.
- (7) Bancher, C.; Braak, H.; Fischer, P. y Jellinger, K.A. (1993) Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci. Lett.* 162: 179-182.
- (8) JELLINGER, K.; B RAAK, H.; B RAAK, E. Y FISCHER, P. (1991) Alzheimer lesions in the entorhinal region and isocortex in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 640: 203-209.
- (9) Bondareff, W.; Mountjoy, C.Q.; Roth, M. y Hauser, D.L. (1989) Neurofibrillary degeneration and neuronal loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 10: 709-715.
- (10) CRAS, P.; S MITH, M.A.; R ICHEY, P.L.; S IEDLAK, S.L.; M ULVIHILL, P. Y PERRY, G. (1995) Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 89: 291-295.

- (11) FUKUTANI, Y.; KOBAYASHI, K.; N AKAMURA, I.; WATANABE, K.; I SAKI, K. Y CAIRNS, N.J. (1995) Neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal ageing and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 200: 57-60.
- (12) IQBAL, K.; F LORY, M.; K HATOON, S.; S OININEN, H.; P IRTTILA, T.; LEHTOVIRTA, M.; ALAFUZOFF, I.; B LENNOW, K.; ANDREASEN, N.; VANMECHELEN, E. Y GRUNDKE-IQBAL, I. (2005) Subgroups of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid molecular markers. *Ann. Neurol.* 58: 748-757.
- (13) Alonso, A.D.; Grundke-Iqbal, I.; B Arra, H.S. y Iqbal, K. (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 298-303.
- (14) MORSCH, R.; S IMON, W. Y COLEMAN, P.D. (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58: 188-197.
- (15) Santacruz, K.; L ewis, J.; S pires, T.; Paulson, J.; K otilinek, L.; I ngelsson, M.; Guimaraes, A.; Deture, M.; R amsden, M.; M cGowan, E.; F orster, C.; Yue, M.; Orne, J.; Janus, C.; Mariash, A.; Kuskowski, M.; Hyman, B.; Hutton, M. y Ashe, K.H. (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 309: 476-481.
- (16) Arrasate, M.; Mitra, S.; Schweitzer, E.S.; Segal, M.R. y Finkbeiner, S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*. 431: 805-810.
- (17) Demuro, A.; Mina, E.; Kayed, R.; Milton, S.C.; Parker, I. y Glabe, C.G. (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* 280: 17294-17300.
- (18) Gomez-Ramos, A.; Diaz-Hernandez, M.; Cuadros, R.; Hernandez, F. y Avila, J. (2006) Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett.* 580: 4842-4850.
- (19) Perez, M.; Hernandez, F.; Gomez-Ramos, A.; Smith, M.; Perry, G. y Avila, J. (2002) Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *Eur. J. Biochem.* 269: 1484-1489.
- (20) Gomez-Ramos, A.; Diaz-Nido, J.; Smith, M.A.; Perry, G. y Avila, J. (2003) Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells. *J. Neurosci. Res.* 71: 863-870.
- (21) Levey, A.I. (1996) Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 13541-13546.

Alberto Gómez Ramos y Jesús Ávila

- (22) Wess, J.; Eglen, R.M. y Gautam, D. (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov*. 6: 721-733.
- (23) Lanzafame, A.A.; Christopoulos, A. y Mitchelson, F. (2003) Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels*. 9: 241-260.
- (24) Gomez-Ramos, A.; Diaz-Hernandez, M.; Rubio, A.; Miras-Portugal, M.T. y Avila, J. (2008) Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 37: 673-681.
- (25) Rosati, A.M.; Guarnieri, E.; Avignone, E.; C herubini, E.; C attaneo, A. y Traversa, U. (1999) Increased density of M1 receptors in the hippocampus of juvenile rats chronically deprived of NGF. *Brain Res.* 815: 185-191.
- (26) GNAGEY, A.L.; SEIDENBERG, M. Y ELLIS, J. (1999) Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* 56: 1245-1253.
- (27) Fritz, N.; Macrez, N.; Mironneau, J.; Jeyakumar, L.H.; Fleischer, S. y Morel, J.L. (2005) Ryanodine receptor subtype 2 encodes Ca2+ oscillations activated by acetylcholine via the M2 muscarinic receptor/cADP-ribose signalling pathway in duodenum myocytes. *J. Cell. Sci.* 118: 2261-2270.
- (28) ISHII, M. Y KURACHI, Y. (2006) Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr. Pharm. Des.* 12: 3573-3581.
- (29) RAPOPORT, M.; DAWSON, H.N.; BINDER, L.I.; VITEK, M.P. Y FERREIRA, A. (2002) Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 6364-6369.

10. Hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia

CECILIO GIMÉNEZ Y FRANCISCO ZAFRA

RESUMEN

La esquizofrenia es una enfermedad compleja que afecta a alrededor del 1% de la población mundial y constituye una de las más importantes causas de discapacidad crónica. Aunque su etiología es desconocida, la enfermedad implica diversas anomalías neuromorfológicas y neuroquímicas y se acepta que factores genéticos, bien solos o potenciados por factores ambientales y epigenéticos juegan un papel importante en su patogénesis. Desde el punto de vista clínico la enfermedad se caracteriza por la aparición de episodios temporales de una serie de síntomas que se clasifican en tres categorías: i) síntomas positivos, que incluyen alucinaciones, ilusiones o paranoia; ii) síntomas negativos, como el aislamiento social, la incapacidad para el afecto o la apatía; y, iii) síntomas cognitivos, como alteraciones en la atención, la memoria y las funciones ejecutivas. Numerosos estudios realizados durante los últimos 40 años han relacionado a alteraciones en la neurotransmisión mediada por aminas biógenas con la patología de las psicosis esquizofrénicas. La llamada «hipótesis dopaminérgica» se basaba en la observación de que fármacos efectivos en el tratamiento de la enfermedad, al menos de los síntomas positivos, son antagonistas de receptores dopaminérgicos. Además, algunos de los síntomas de la esquizofrenia pueden ser reproducidos por drogas como las anfetaminas, que actúan elevando el tono dopaminérgico. Datos experimentales más recientes también han implicado a la neurotransmisión glutamatérgica en la enfermedad, en lo que se conoce como «hipótesis de la hipofunción de los receptores de NMDA». Esta hipótesis deriva de la observación de que diversos antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA como la ketamina, la fenciclidina o el MK-801 mimetizan numerosos síntomas de la esquizofrenia en individuos adultos sanos y recrudecen los síntomas en individuos esquizofrénicos, tanto en lo que se refiere a los

CECILIO GIMÉNEZ Y FRANCISCO ZAFRA

síntomas positivos, como a los negativos y cognitivos. Esta hipótesis se ha visto reforzada por el descubrimiento de varios genes de susceptibilidad relacionados con las vías glutamatérgicas (G72, NRG1, GRIA4, GRM3, GRM8, GRIN2D, o GRIN2A). De cualquier forma, la hipótesis glutamatérgica y la dopaminérgica no son mutuamente excluyentes ya que, por ejemplo, la liberación de glutamato está regulada por receptores presinápticos de dopamina D2 en las vías corticolímbicas y corticoestriatales. De esta hipótesis se deriva que la elevación de los niveles de glutamato o de su coagonista glicina pueda ser beneficiosa en el tratamiento de la enfermedad. De hecho, en este momento hay varios compuestos en fase clínica de investigación que actúan sobre la neurotransmisión glutamatérgica, y más concretamente sobre el sitio de glicina del receptor de NMDA.

Palabras clave: Receptores NMDA. Glicina. Glutamato. Transportadores. Psicosis.

ABSTRACT

Glutamatergic hypothesis of schizofrenia

The schizophrenia is a complex disease that affects up to 1% of the population worldwide, and is one of the leading causes of chronic disability. While its etiology is currently unknown, it is accepted that genetic factors, either alone or in combination with environmental or epigenetic factors, play an important role in its pathogenesis. From a clinical point of view, this disease is characterized by the appearance of temporal episodes of a number of symptoms that are classified into three categories; i) positive symptoms, which include hallucinations, illusions and paranoia; ii) negative symptoms, like social isolation, inability for affection or apathy; and iii) cognitive symptoms, like alterations in attention, memory and executive functions. Many studies performed along the last 40 years have related alterations in biogenic amines neurotransmission with the pathology of schizophrenic psychosis. The so called «dopaminergic hypothesis» was based on the observation that some compounds that were effective in treatment of this disease, at least in positive symptoms, were blockers of the dopamine receptors. Moreover, some of the symptoms of schizophrenia are recapitulated by abuse drugs like amphetamines, which increase the dopaminergic tone. More recent experimental data also involve glutamatergic neurotransmission in schizophrenia through the so called «hypofunction of NMDA receptors hypothesis». This hypothesis derives from the observation that various

antagonists of the NMDA subtype of glutamate receptor, like ketamine, phency-clidine or MK801 mimics numerous symptoms of schizophrenia in healthy adult individuals and potentiates the symptoms in schizophrenic patients, either the positive, or negative and cognitive symptoms. This hypothesis has been reinforced by the discovery of several susceptibility genes that are related to the glutamatergic pathways (*G72*, *NRG1*, *GRIA4*, *GRM3*, *GRM8*, *GRIN2D*, *o GRIN2A*). Anyhow, the glutamatergic and dopaminergic hypotheses are not mutually exclusive since, for instance, glutamate release is controlled by presynaptic D2 dopamine receptors in corticolimbic and corticostriatal pathways. From the glutamatergic hypothesis derives that elevation in glutamate levels, or those of the obligate co-agonist glycine, might be beneficial for treatment of this illness. In fact, there are several compounds in clinical stages of research that act on glutamatergic neurotransmission, more concretely on the glycine binding site on the NMDA receptor.

Keywords: NMDA receptors. Glycine. Glutamate. Transporters. Psychosis.

INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia es una enfermedad compleja que afecta a alrededor del 1% de la población mundial y constituye una de las más importantes causas de discapacidad crónica. Aunque su etiología es desconocida, la enfermedad implica diversas anomalías neuromorfológicas y neuroquímicas y se acepta que factores genéticos, bien solos o potenciados por factores ambientales y epigenéticos juegan un papel importante en su patogénesis. Desde el punto de vista clínico la enfermedad se caracteriza por la aparición de episodios temporales de una serie de síntomas que se clasifican en tres categorías: i) síntomas positivos, que incluyen alucinaciones, ilusiones o paranoia; ii) síntomas negativos, como el aislamiento social, la incapacidad para el afecto o la apatía; y, iii) síntomas cognitivos, como alteraciones en la atención, la memoria y las funciones ejecutivas. Se puede decir que el coste personal para el enfermo y la carga para la familia, así como el coste económico para la sociedad es enorme (1, 2).

Numerosos estudios realizados durante los últimos 40 años relacionaron alteraciones de la neurotransmisión mediada por aminas biógenas con la patología de las psicosis esquizofrénicas. De hecho, el primer tratamiento efectivo en el tratamiento de la esquizofrenia se descubrió de manera fortuita a finales de los años cincuenta demostrándose con posterioridad la participación de receptores dopaminérgicos del tipo D2 en el mismo. La llamada «hipótesis dopaminérgica» ha prevalecido hasta hace muy poco y se basaba en la observación de

CECILIO GIMÉNEZ Y FRANCISCO ZAFRA

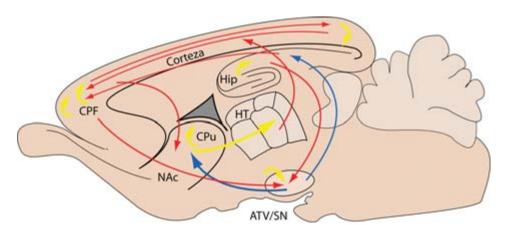


FIGURA 1. Esquema de un corte sagital de cerebro de rata en el que se indican las principales vías de neurotransmisión involucradas en psicosis. Líneas rojas, glutamatérgicas; azules, dopaminérgicas; amarillas, gabaérgicas. ATV, área ventral tegmental; SN, substancia nigra; HT, hipotálamo; NAc, núcleo aumbens; Cpu, caudado putamen; CPF, corteza prefrontal; Hp, hipocampo.

que prácticamente todos los fármacos efectivos en el tratamiento de la enfermedad como el haloperidol (los llamados antipsicóticos «típicos»), o como la clozapina o la olanzapina (los llamados «atípicos»), son antagonistas de receptores dopaminérgicos D2 (Figura 1). Todo ello, junto con la observación de que agonistas dopaminérgicos indirectos como la cocaína o las anfetaminas, que actúan elevando el tono dopaminérgico, inducen algunos de los síntomas de la esquizofrenia, apoyaron la idea de que alteraciones en niveles de dopamina constituían el agente causal de la enfermedad (3-5).

En un periodo de casi cuarenta años, numerosas compañías farmacéuticas han desarrollado compuestos que, actuando sobre receptores dopaminérgicos D2, actuaran como antipsicóticos. Sin embargo, todos estos fármacos presentan deficiencias en su acción en varios sentidos. Aproximadamente el 25% de los pacientes con esquizofrenia no experimentan mejoría alguna tras el tratamiento. Por otra parte, los antagonistas de los receptores D2 solamente son efectivos para el tratamiento de síntomas positivos de la enfermedad, mientras que los síntomas negativos y el déficit cognitivo permanecen. Más aún, los efectos secundarios derivados del tratamiento son muy numerosos e incluyen sedación, ganancia de peso, disfunción sexual y toda una gama de síntomas propios de enfermedades como la diabetes, el Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (revisiones en 6 y 7).

Todos los datos acumulados durante años de práctica clínica en el tratamiento de la esquizofrenia, junto con datos experimentales más recientes, llevaron al convencimiento de que la hipótesis de la hiperfunción dopaminérgica constituía sólo una parte de la etiología de la enfermedad. Resumiendo observaciones de los últimos años cabe destacar las siguientes. Tal como se ha comentado anteriormente, estimulantes del sistema psicomotor como las anfetaminas y la cocaína, así como alucinógenos de la familia del ácido lisérgico eran bien conocidos por inducir estados de psicosis en humanos (síntomas positivos clásicos de la esquizofrenia). Por el contrario, se descubrió que la administración de antagonistas del receptor de glutamato del tipo NMDA (NMDARs) como fenilciclidina (PCP), dizocilpina (MK-801) o la ketamina, hacen aparecer de una forma asombrosamente mimética tanto síntomas positivos como negativos y cognitivos de la esquizofrenia. Estos datos, primariamente observados en animales, han sido repetidamente comprobados en grupos de humanos clínicamente controlados o en individuos consumidores de PCP como droga de abuso, los cuales presentan síntomas clínicamente indistinguibles de individuos esquizofrénicos. Por otro lado, y en sentido contrario, hay evidencias clínicas de que la administración a pacientes esquizofrénicos de co-agonistas de receptores NMDA les hacen mejorar, aunque de forma modesta, de muchos de los rasgos característicos de la enfermedad (8).

En los últimos años, evidencias experimentales como las reseñadas más arriba han llevado al convencimiento de que la neurotransmisión glutamatérgica está implicada en la enfermedad, en lo que actualmente se conoce como «hipótesis de la hipofunción de los receptores de NMDA» (9, 10). Esta hipótesis se ha visto reforzada por el descubrimiento de varios genes de susceptibilidad relacionados con las vías glutamatérgicas (G72, NRG1, GRIA4, GRM3, GRM8, GRIN2D, o GRIN2A) (11). De cualquier forma, la hipótesis glutamatérgica y la dopaminérgica no son mutuamente excluyentes ya que, por ejemplo, la liberación de glutamato está regulada por receptores presinápticos de dopamina D2 en las vías corticolímbicas y corticoestriatales. De esta hipótesis se deriva que la elevación de los niveles de glutamato y de su coagonista glicina (ver más abajo) puedan ser beneficiosos en el tratamiento de la enfermedad. De hecho, en este momento hay un número considerable de compuestos en fase clínica de investigación, que actúan sobre la neurotransmisión glutamatérgica, y más concretamente sobre el receptor metabotrópico GRM3 o sobre el sitio de unión de glicina al receptor de NMDA (12-15).

NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El glutamato, aparte de constituir uno de los veinte aminoácidos proteinogenéticos, es el neurotransmisor mayoritario en el sistema nervioso central de los mamíferos. Se puede afirmar que prácticamente todas las vías tálamo-

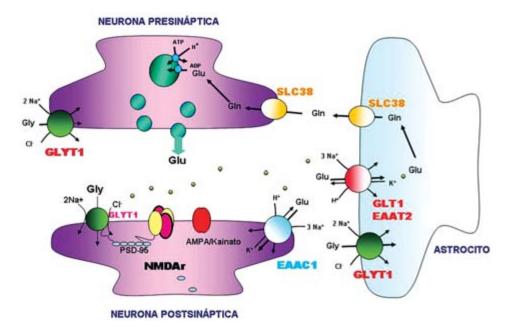


Figura 2. Esquema de una sinapsis glutamatérgica que incluye el ciclo glutamato-glutamina. GLT1, transportador de glutamato; GLYT1, transportador de glicina tipo 1; SLC38, transportador de glutamina. Se esquematizan los receptores de glutamato del tipo AMPA y NMDA.

corticales, córtico-corticales y la mayoría de las aferentes de la corteza están mediadas por glutamato. Esto hace que alrededor del 60% de todas las neuronas del cerebro, incluyendo las piramidales de la corteza y las neuronas de relevo del tálamo, utilicen glutamato como neurotransmisor. El glutamato se acumula en el interior de las vesículas sinápticas de las neuronas glutamatérgicas, donde puede alcanzar concentraciones por encima de 100 mM, y es liberado por las mismas en respuesta a despolarizaciones de la neurona mediante un sistema de exocitosis dependiente de calcio, o por reversión de alguno de sus transportadores. El glutamato ya liberado se recicla mediante la actuación de transportadores específicos y dependientes de sodio, que controlan además su concentración extracelular dentro de límites muy estrechos (Figura 2). Esta función de regulación de concentraciones adecuadas de glutamato extracelular es tan importante que consume aproximadamente dos tercios de toda la energía metabólica generada por el cerebro. Posteriormente, el glutamato interacciona con uno de los receptores postsinápticos o gliales cercanos al terminal nervioso completando la vía de señalización nerviosa rápida mediada por este neurotransmisor.

El glutamato ejerce su acción a través de receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos, aunque la neurotransmisión glutamatérgica rápida está mediada por los primeros puesto que los receptores metabotrópicos, a través de su asociación con proteínas G, median efectos neuromoduladores a largo plazo. Receptores ionotrópicos de glutamato hay de tres clases: receptores AMPA (por ácido αamino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolenpropionico), receptores de kainato, y receptores NMDA (por N-metil-D-aspartato). Todos ellos son proteínas multiméricas de membrana que, tras su unión a glutamato, responden abriendo un canal iónico induciendo así corrientes excitatorias postsinápticas. De todos ellos, los receptores de glutamato implicados en la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia son los receptores del tipo NMDA, y en ellos centraremos este capítulo. Más aún, estos receptores no sólo intervienen en la transmisión rápida de la señal eléctrica sino que, gracias a la permeabilidad a calcio, activan numerosas rutas de señalización intracelular esenciales en la activación de procesos de plasticidad neuronal, base de la memoria o el aprendizaje. La sobreestimulación de estos receptores está asociada al fenómeno de la excitotoxicidad, que conlleva la muerte de las neuronas y que está asociada a procesos patológicos como los observados en episodios isquémicos o neurodegenerativos (revisiones en 16, 17).

Receptores de glutamato NMDA

Los receptores de glutamato del tipo NMDA son proteínas de membrana muy complejas tanto desde el punto de vista estructural como funcional. Los NMDARs son estructuras oligoméricas que forman un canal catiónico operado por ligando el cual permite la permeación de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. Los NMDARs presentan una serie de propiedades que los hacen únicos entre los canales iónicos dependientes de ligando, como son su bloqueo por Mg²⁺ dependiente de voltaje y su alta permeabilidad a Ca²⁺ (16, 17).

Constituyen una familia en la que cada miembro está compuesto por varias subunidades (generalmente cuatro) de las cuales al menos una es del tipo NR1 y una o varias subunidades reguladoras del tipo NR2A-NR2D, lo que proporciona una gran diversidad de formas moleculares diferentes. Hasta el momento sólo se ha clonado un gen del tipo NR1 y cuatro del tipo NR2. Para que el receptor sea funcional, al menos debe estar formado por una subunidad del tipo NR1 y una del tipo NR2. Las subunidades del tipo NR1 son sintetizadas en exceso por las células nerviosas, y son retenidas en el retículo endoplasmático hasta que puedan ser ensambladas con unidades del tipo NR2. La isoforma NR2D constituye una forma de aparición temprana durante los primeros estadios del

desarrollo la cual va disminuyendo con la edad hasta alcanzar valores mínimos en el adulto. Las formas NR2A y NR2B son las predominantes en el cerebro mientras que la NR2C se encuentra principalmente en cerebelo. La diferente composición en subunidades proporciona características propias a cada forma del receptor, lo que se traduce en localizaciones regionales diferentes y en propiedades funcionales diferentes: tiempo de apertura del canal, variación en las propiedades de permeación, etc. (18, 19).

La complejidad funcional de los receptores NMDA a la que se aludía anteriormente, se manifiesta por el gran número de sitios de reconocimiento y unión a ligandos que poseen, así como por las interacciones alostéricas que las mismas provocan. Además del sitio de unión a glutamato, estos receptores contienen un sitio de unión a substratos endógenos como glicina y D-serina, aunque ninguno de los dos tiene la capacidad de abrir el canal en ausencia de glutamato. El sitio de unión a glicina regula, en presencia del co-agonista principal el glutamato, el tiempo de apertura del canal así como la velocidad de desensibilización del mismo. A pesar de que la glicina es necesaria, junto con el glutamato, para la activación de los NMDARs, durante mucho tiempo ha existido una polémica importante sobre el papel fisiológico de la misma en la sinapsis glutamatérgica. Esto se debió al hecho de que la afinidad del sitio de glicina es tan alta que muchos autores pensaron que estaría tónicamente saturado a las concentraciones de glicina habituales en la hendidura sináptica (10 µM) (20). Sin embargo, cálculos teóricos basados en las propiedades electrofisiológicas de los transportadores de glicina GLYT1 indicaban que estas proteínas podrían reducir la concentración de glicina en el emplazamiento local del NMDAR hasta una concentración de 1 µM o menos, es decir, hasta niveles no saturantes (21, 22). Esta posibilidad se ha visto reforzada por estudios funcionales recientes que muestran que el compuesto N-(3-4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)propil-sarcosina (NFPS), un inhibidor específico del transportador de glicina GLYT1, potencia las respuestas mediadas por NMDA tanto in vitro como in vivo (23, 24). A esta función de «aclaramiento» de los niveles de glicina también pueden contribuir, como se describirá más adelante, otros transportadores de aminoácidos neutros (SNATs) capaces de retirar glicina del espacio extracelular.

Los NMDARs contienen, además del sitio de unión a glicina, otros sitios reguladores que reconocen poliaminas, protones, Zn²⁺ y glutation (entre otros agentes redox). El significado fisiológico, la interacción y coordinación de todos estos sitios reguladores no se conocen con detalle hasta el momento, pero da una idea de la complejidad de funcionamiento de estas proteínas, así como de su intervención en múltiples procesos. Otro aspecto muy interesante de estos receptores es que se bloquean por iones Mg²⁺ en un proceso dependiente de

voltaje. Esta singularidad hace que puedan funcionar en forma de «apagado» o «encendido» por simples cambios en el potencial de membrana. El Mg²+ se une a un sitio específico que se encuentra en el interior del poro iónico y cercano físicamente al sitio de unión de los antagonistas (bloqueantes) del canal (ketamina, fenilciclidina, dizocilpina). Como resultado de estas interacciones, es que los NMDARs son los únicos receptores sensibles a voltaje además de sensibles a ligando, lo que les sitúa en una «posición de privilegio» para, integrando señales múltiples, actuar en procesos de potenciación a largo plazo.

Los receptores de glutamato del tipo NMDA y AMPA funcionan de forma coordinada y se encuentran físicamente cercanos en las densidades postsinápticas. La activación de receptores AMPA proporcionan la despolarización primaria de la membrana necesaria para retirar el bloqueo por Mg²+ de los NMDARs y permitir así la entrada de Ca²+ en el interior celular. De hecho, antagonistas selectivos de los receptores AMPA podrían ser efectivos en situaciones como el ictus o la epilepsia donde las concentraciones extracelulares de glutamato son muy altas (superiores a 1-5 µM, que son las normales) actuando como excitotóxico (12). Un aspecto importante referente a este tipo de interacciones concertadas entre proteínas de las sinapsis es su imperiosa necesidad de posicionarse en el sitio adecuado y en el momento oportuno. Tanto los NMDARs como los de AMPA interaccionan con proteínas adaptadoras a través de las cuales se anclan en las densidades postsinápticas (PSD) a otras proteínas como quinasas, fosfatasas, transportadores y a receptores metabotrópicos de glutamato donde actúan formando grandes complejos macromoleculares de señalización (revisión en 25).

Los NMDARs se unen a PSD-95 (synapse-associated protein-90) y a SAP-102 (synapse associated protein-102) dos proteínas adaptadoras con dominios PDZ. La unión a través de proteínas de andamiaje interpuestas proporciona un entorno propicio para la actuación de estas proteínas en la función sináptica puesto que las fija y posiciona de una forma idónea para su función. Sin embargo, la propiedad de estos receptores para adherirse a proteínas de andamiaje molecular en las densidades postsinápticas no puede verse de una forma completamente estática. Hoy se sabe que estos macrocomplejos cambian de forma dinámica dependiendo del tipo celular y de las condiciones o en respuesta a estímulos sensoriales. En primer lugar, para que los receptores de membrana funcionen normalmente requieren una biogénesis y direccionamiento exacto a su destino en la sinapsis, en este caso a las densidades postsinápticas de neuronas glutamatérgicas, y de forma coordinada con proteínas asociadas como ocurre con receptores AMPA y NMDA. Por ejemplo, en sinapsis nacientes se sabe que las subunidades de NMDARs sintetizadas en el cuerpo celular recorren un largo camino a lo largo de los microtú-

bulos hasta su lugar de destino empaquetadas en vesículas que «reconocen» su localización final axodendrítica. Los receptores AMPA hacen un viaje similar, pero de forma más lenta y en vesículas diferentes. Las subunidades de estas proteínas, una vez sintetizadas, maduran en el retículo endoplasmático e interaccionan finalmente con SAP-102 en el Golgi y SEC8, una proteína del complejo del exocisto. Allí son empaquetadas en vesículas, las cuales son transportadas por los microtúbulos con el concurso de proteínas adaptadoras (LIN2, LIN7 y LIN10) mediante la kinesina17, una proteína motora móvil. Estos complejos se mueven de manera anterógrada y retrógrada hasta alcanzar sus destinos en las espinas dendríticas. Los últimos pasos en el tráfico del receptor hasta su inserción en la membrana están regulados por fosforilación dependiente de PKC y de PKA. A pesar de la intensa investigación sobre estos receptores en las últimas dos décadas, aún no se conocen bien el número, la composición en subunidades y su función tanto sináptica como extrasináptica (25).

Interacciones de los NMDARs con proteínas PDZ como PSD-95, y otras mencionadas anteriormente, se realiza con la intervención de motivos estructurales específicos que se encuentran en los largos extremos carboxilo de las subunidades NR2 localizados intracelularmente (26). La unión de los NMDARs con PSD-95 no sólo proporciona un sitio de anclaje, sino que hace variar las propiedades funcionales del canal: aumenta su apertura y disminuye su desensibilización tras respuestas continuadas.

El número y la composición en subunidades de los NMDARs en las sinapsis no sólo están regulados por la expresión génica y la síntesis proteica dependiente de estímulos, sino también mediante la regulación de su degradación a través del sistema del proteasoma dependiente de ubiquitina.

El resultado final es que estos receptores están sometidos a un tráfico intracelular muy dinámico hacia la membrana, desde la membrana o a su degradación. Por otra parte, se sabe que se mueven lateralmente cambiando así su localización e interacción con otras proteínas de membrana. Una interacción muy interesante de los receptores NMDA es su unión a receptores dopaminérgicos del tipo D1 a través de movimientos laterales de los dos receptores. Este tipo de interacciones, demostradas en células en cultivo, se han confirmado morfológicamente. En neuronas de estriado se ha demostrado la existencia de sinapsis complejas en la que una misma espina dendrítica es el blanco de una sinapsis asimétrica glutamatérgica y de una sinapsis simétrica dopaminérgica. Estas asociaciones son de un gran interés funcional y abren unas posibilidades enormes en cuanto a las implicaciones fisiopatológicas que puedan tener, aunque hasta el momento se desconocen en gran medida (27).

Receptores NMDA y esquizofrenia

Datos recientes obtenidos en estudios con animales de experimentación han llevado a la idea generalizada de que una hipofunción en los receptores NMDA está involucrada en la etiología de la esquizofrenia. Ratones con niveles de la subunidad NR1 ligeramente inferiores a los normales, y ratones KO de la subunidad NR2 muestran un comportamiento muy similar a síntomas clínicos de esquizofrenia que pueden ser atenuados mediante el tratamiento con antipsicóticos. Por otra parte, animales genéticamente modificados en el sitio de unión de glicina en NMDAR1 muestran alteraciones en procesos de potenciación a largo plazo (LTP) y de aprendizaje. Estos datos, junto con otros derivados de la clínica, son los que apoyan el papel de los receptores NMDA en esquizofrenia, y el convencimiento de que agentes capaces de potenciar la actividad de receptores NMDA pueden mejorar los síntomas positivos, negativos y cognitivos de la enfermedad. Como se indicó anteriormente, esta hipótesis ni anula ni está en contraposición con la hipótesis de la hiperfunción dopaminérgica en esquizofrenia. De hecho hoy se sabe experimentalmente que una hipofunción en la actividad de receptores NMDA podría ser responsable de una situación hiperdopaninérgica. El flujo de dopamina aumenta tras el tratamiento con agentes antagonistas de NMDA y, por otra parte, agentes antipsicóticos atípicos revierten los efectos psicomiméticos producidos por PCP y ketamina (revisado en 9).

Los receptores NMDA, puesto que poseen tantos y tan variados sitios moduladores de regulación deberían ofrecer, al menos en teoría, muchas posibilidades de manipulación farmacológica. Sin embargo, todos los agonistas directos de los receptores sintetizados y ensayados hasta el momento, han resultado ser neurotóxicos o conllevan efectos indeseados paralelos muy importantes. Una vía indirecta de activación de los receptores NMDA parece ser más efectiva. Se trata de intervenir a través de sitios moduladores indirectos como el sitio de unión de aminas y, sobre todo, el sitio del co-agonista obligado glicina. A través de este mecanismo, los niveles de glutamato no se alteran o son regulados extracelularmente por sus transportadores. Los primeros ensayos clínicos administrando glicina a pacientes esquizofrénicos han dado resultados modestos, posiblemente debido a la baja penetración de la glicina, aunque indefectiblemente apoyan la hipótesis glutamatérgica de la enfermedad. Mucho más efectivos parecen ser las aproximaciones derivadas del aumento de niveles sinápticos de glicina mediante la inhibición de sus sistemas de recaptura, tal como se describirá más adelante.

Sistemas de transporte de glutamato

El glutamato es recapturado de las sinapsis glutamatérgicas por miembros de la familia génica SLC1, que está constituida por sistemas de transporte activo secundario acoplados al movimiento de los iones sodio y potasio. Se conocen cinco genes implicados en este proceso (denominados EAAT1 o GLAST, EAAT2 o GLT1, EAAT3, EAAT4 y EAAT5) (28). Algunos de ellos generan varias proteínas por mecanismos de procesamiento alternativo. Todos los transportadores de la familia poseen un alto nivel de conservación de la secuencia peptídica que sugiere una organización estructural común. De hecho, todos ellos podrían tener un origen común con un transportador de la arquebacteria termófila Pyrococcus horikoshii denominado Glt_{Ph}, y cuya estructura tridimensional ha sido desvelada por E. Gouaux y sus colaboradores (29) (Figura 3). El transportador tiene una organización homo-oligométrica (trimérica) en donde la asociación de las tres subunidades genera un espacio en forma de cuenco relleno de solvente y que penetra parcialmente en la membrana. En el fondo de este cuenco se localizan tres poros independientes de permeación para el glutamato y los iones asociados, un poro por cada subunidad. Una subunidad está constituida por ocho hélices transmembrana más dos horquillas helicoidales (HP1 v HP2, Figura 3), horquillas que penetran parcialmente en la membrana y que actúan a manera de compuertas, una desde el exterior y otra desde el interior. Sería el movimiento concertado de estas dos horquillas el que permitiría el acceso alternante al medio extracelular y al intracelular, de forma que se posibilita así la unión y el paso de glutamato y de los iones sodio y potasio a través de la membrana.

Cada uno de los cinco transportadores de mamíferos tiene una localización específica en el sistema nervioso, lo que es un claro indicio de que desarrollan funciones diferenciales. Tanto GLAST como GLT1 están ampliamente extendidos por las diversas regiones del cerebro, aunque la concentración de GLT1 es mayor en la corteza y el hipocampo, mientras que la de GLAST lo es en el cerebelo (30). Ambas son mayoritariamente proteínas gliales, aunque recientemente se ha demostrado que GLT1 también se expresa en algunas subpoblaciones de neuronas de la corteza cerebral (31). EAAT3 también tiene una expresión bastante extendida pero circunscrita a las neuronas, observándose especialmente en elementos postsinápticos (32). Los otros transportadores tienen distribuciones más restringidas, con EAAT4 en las células de Purkinje del cerebelo (33), y EAAT5 en la retina, en donde se encuentra tanto en los fotorreceptores (conos y bastones) como en los axones de las células bipolares (34). Con la excepción de EAAT5, se han generado ratones mutantes carentes de cada uno de estos genes,

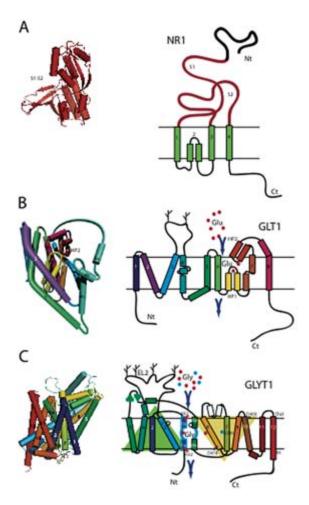


Figura 3. Representación esquemática de las estructuras del receptor de NMDA y de los transportadores de glutamato y glicina. A) Esquema de la estructura transmembrana de la subunidad NR1 del receptor de NMDA (panel izquierdo). La estructura tridimensional de los dominios extracelulares S1 y S2 ha sido resuelta mediante técnicas cristalográficas (panel derecho). B) Esquema de la estructura transmembrana del transportador de glutamato GLT1 (panel izquierdo) en donde se indican los dominios transmembrana 1-8 y las horquillas reentrantes HP1 y HP2, que constituyen parte esencial del sitio de unión de glutamato y de los iones sodio. Esta estructura es hipotética y está basada en la estructura tridimensional del homólogo Glt (Ph) de la arquebacteria Pyrococcus horikoshii (panel derecho). C) Esquema de la estructura transmembrana del transportador de glicina GLYT1 (panel izquierdo) en donde se indican los dominios transmembrana 1-12 con los principales residuos implicados en la translocación de glicina y de los iones sodio y cloruro, que se localizan principalmente en los segmentos transmembrana 1 y 6. La estructura pseudosimétrica de la molécula se remarca mediante los triángulos coloreados. Esta estructura es hipotética y está basada en la estructura tridimensional del transportador homólogo LeuT_{Aa} de la bacteria Aquifex aeolicus (panel derecho).

lo que ha permitido empezar a comprender las funciones específicas en las que está implicado cada transportador. De todos ellos, GLT1 representa la principal vía de terminación de la neurotransmisión glutamatérgica ya que da cuenta del 90% de la recaptura de glutamato en las regiones del cerebro anterior y, por tanto, juega un papel esencial en el control de la excitabilidad de las neuronas. Además de regular la transmisión de señales en las sinapsis, GLT1 mantiene los niveles de glutamato por debajo del umbral de toxicidad para las neuronas. Por ello, los ratones mutantes que carecían del gen GLT1 sufrían convulsiones epilépticas letales similares a las producidas por NMDA. Además, eran muy sensibles a lesiones corticales agudas y presentaban degeneración de las neuronas del hipocampo (35). De hecho, GLT1 se ha asociado al desarrollo o la progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas humanas, como la esclerosis amiotrófica lateral (ALS), enfermedad en la que se observó una importante reducción de los niveles de este transportador, tanto en modelos animales como en pacientes (la forma humana se denomina EAAT2) (36). Por otra parte, los ratones deficientes en GLAST mostraban alteraciones en el desarrollo de las conexiones sinápticas establecidas por las fibras trepadoras en el cerebelo y, además, presentaban una elevada sensibilidad en el cerebelo a las lesiones excitotóxicas producidas tras una lesión aguda del mismo (37). También la eliminación de EAAT3 in vivo con oligonucleótidos antisentido generaba convulsiones epilépticas, mientras que la eliminación del gen por recombinación homóloga produjo neurodegeneración en los ratones (38, 39). Este último efecto fue atribuido a alteraciones en el metabolismo del glutation, ya que EAAT3 no solo transporta glutamato sino también cisteína, necesaria para la síntesis de glutation (39). La eliminación del gen EAAT4 afecta a las corrientes iónicas en las sinapsis entre las fibras trepadoras y las células de Purkinje (40) y produce un incremento en la actividad de los receptores metabotrópicos de glutamato en estas sinapsis cerebelares (41). En resumen, estos trabajos revelan la importancia fisiológica de los transportadores de glutamato, y enfatizan la necesidad de conocer los mecanismos que regulan la expresión de sus respectivos genes y la actividad de la proteína con objeto de poder manipular farmacológicamente estos procesos. Aunque dichos mecanismos reguladores no están bien definidos, se han encontrado vías de señalización que afectan a la transcripción de los genes y otras que producen modificaciones posttraduccionales que modulan la actividad de los transportadores. Ejemplos de modificación de la transcripción los encontramos en GLT1 cuya expresión glial está sometida a regulación por factores proteicos liberados por las neuronas, un efecto que es mimetizado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), por PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) y por AMP cíclico. Estos tratamientos parecen actuar sobre el promotor del gen y dependen de la fosfatidilinositol 3-quinasa y del factor de transcripción NF-kB (42). De la misma manera, hay varios efectores que modulan la actividad de GLT1, como el ácido araquidónico, los radicales libres, las proteína quinasas A y C, las quinasas inducibles por suero y glucocorticoides (SGK1, SGK2, y SGK3) (43-45). Algunas de estas modificaciones actúan a través de cambios en el tráfico intracelular, bien hacia la membrana o desde la membrana, promoviendo la endocitosis y la degradación de la proteína (46, 47). También se conocen diversas proteínas que interaccionan con los transportadores de glutamato determinando su ubicación precisa, como por ejemplo interacciones con proteínas con dominios PDZ. De hecho, todos los miembros de la familia SLC1, excepto una de las isoformas de GLT1 (GLT1a), presentan en sus extremos carboxilo el motivo peptídico necesario para interaccionar con proteínas PDZ (48). Estas proteínas suelen actuar como andamiajes organizadores que ponen en contacto a las proteínas de la superficie celular con proteínas reguladoras intracelulares (26).

En cuanto a la relación de los transportadores de glutamato y la esquizofrenia, se ha observado que en el tálamo de pacientes esquizofrénicos hay una mayor expresión del mRNA para EAAT2 (y también para EAAT1), así como del mRNA y la inmunorreactividad en el córtex prefrontal de pacientes no tratados (49). Por otra parte, estudios clásicos habían puesto de manifiesto un efecto inhibidor del neuroléptico clorpromacina sobre el transporte de glutamato en tratamientos agudos. Además, el tratamiento con el fármaco antipsicótico clozapina produce una disminución de los niveles de EAAT2 en diferentes regiones del cerebro (50). También se han encontrado alteraciones en los niveles de mRNA para EAAT2 en individuos portadores de alelos del gen GRM3 (receptor metabotrópico de glutamato-3) que predisponen a la esquizofrenia (51). Estos datos son compatibles con la idea de que una mayor actividad de los sistemas de transporte en los pacientes esquizofrénicos disminuye la disponibilidad de glutamato y por tanto la neurotransmisión glutamatérgica. No obstante, la relación puede ser más compleja, ya que también hay evidencias en sentido contrario: un ratón carente de GLAST, cuyos niveles de glutamato deberían estar incrementados, presenta comportamientos de tipo esquizoide, y que son prevenidos tanto por haloperidol como por antagonistas de los receptores de glutamato 2/3 (52). Este resultado, junto con otros en los que se ha observado una paradójica elevación de la actividad glutamatérgica en el cortex prefrontal tras el bloqueo de los NMDARs, podría interpretarse si dichos NMDARs estuvieran localizados en las interneuronas GABAérgicas. La pérdida de la inhibición GABAérgica incrementaría la liberación de glutamato.

REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE GLICINA EN LA SINAPSIS GLUTAMATÉRGICAS

Transportadores de glicina de alta afinidad

Las concentraciones de glicina en el SNC son reguladas principalmente por los miembros de la familia de transportadores de neurotransmisores dependientes de sodio y de cloruro (familia SLC6), denominados GLYT1 y GLYT2, y que unen glicina con una alta afinidad (53). Probablemente otros transportadores de aminoácidos neutros, especialmente los de la familia SLC38, también podrían contribuir de manera significativa a los procesos de transporte de glicina, a pesar de tener una menor afinidad por la glicina que GLYT1 o GLYT2 (54).

GLYT1 y GLYT2 son dos glicoproteínas que comparten aproximadamente un 50% de identidad de secuencia y que se pueden distinguir farmacológicamente, ya que GLYT1 es inhibible por sarcosina (N-metilglicina) mientras que GLYT2 no lo es (55). Sobre esta base se generó una primera serie de compuestos derivados de la sarcosina que resultaron ser inhibidores específicos y de alta potencia para GLYT1, como el ya mencionado NFPS, el ORG24598, el NPTS, o el CP-802079. Posteriormente se han sintetizado otros inhibidores de GLYT1 no derivados de sarcosina como los Janssen WO19944596, Gliatech G-T6006, SKB WO2003055478, Glaxo 200505855478 o Merk WO2005046601, entre otros (56). También se han sintetizado inhibidores específicos de GLYT2, como ORG 25543, ALX 1393 o Janssen WO2005044810. La estructura de estas proteínas es todavía desconocida, al igual que lo es la de los otros transportadores de neurotransmisores de la misma familia, como son los de GABA (GAT1-3), los de aminas biógenas (DAT, NET y SERT) y otros (57). Sin embargo, recientemente E. Gouaux y colaboradores también han resuelto la estructura de un homólogo bacteriano (58). En concreto, la de un transportador de leucina del microorganismo Aquifex aeolicus denominado LeuT_{Aa}. Aunque la homología de secuencia de los miembros de SLC6 con $LeuT_{Aa}$ es de aproximadamente de un 20-25%, esta es mayor en los dominios transmembrana y en los residuos que se presumen importantes para el proceso de translocación del aminoácido y los iones asociados (58) (Figura 3). De hecho, estos datos estructurales se están usando como referencia para el modelado de los transportadores eucarióticos y, consecuentemente, para el diseño de nuevos experimentos que aclaren las relaciones estructura-función en estas importantes proteínas. Brevemente, LeuT_{A3} es una proteína homodimérica donde cada subunidad contiene 12 dominios transmembrana (TM). Los diez primeros contienen una repetición estructural interna, de forma que las mitades TM1-5 y TM6-10 se disponen simétricamente en torno

a un eje pseudobinario localizado en el plano de la membrana. Los residuos implicados en la unión del sustrato y de los iones asociados se localizan principalmente en la interfase entre estas dos mitades, en TM1 y TM6, que son alfahélices parcialmente desenrolladas en su zona central. Esta zona permanece ocluida por dos compuertas, una en la zona extracelular, constituida básicamente por un puente salino (Arg30/Asp404), y una en la cara citoplasmática, mantenida por otro par iónico (Arg5/Asp369). El modelo estructural predice que los sustratos y los iones se unen cuando la puerta externa está abierta y la interna cerrada. La unión de éstos promueve un cambio conformacional que cierra la puerta externa y abre la interna permitiendo la difusión del sustrato al citoplasma. La validez de esta estructura como base de la estructura de los transportadores eucarióticos se ha visto apoyada por experimentos como los que han permitido identificar los residuos de GLYT1 y GLYT2 responsables de la sensibilidad diferencial a sarcosina. En concreto está implicado un residuo del TM6 (Gly 305 de GLYT1 y su equivalente Ser481 de GLYT2) (59). Los datos de modelado por homología también revelan que el hueco en donde encaja la glicina es mucho más pequeño en GLYT1 o GLYT2 que en LeuT, Otros experimentos viene a corroborar la validez del modelo estructural son los que han permitido identificar los sitios de unión de los iones sodio y cloruro en diversos miembros de la familia SLC6 (60, 61).

GLYT1 y GLYT2 poseen una distribución en el SNC claramente diferencial, lo que es congruente con la función específica que desarrolla cada una de ellas. Ambas proteínas están enriquecidas en la médula espinal y el tallo cerebral, y aquí ambas participan en la neurotransmisión glicinérgica inhibidora, aunque con papeles diferenciados. Mientras que GLYT2 se expresa casi exclusivamente en los terminales presinápticos de la interneuronas que liberan glicina, GLYT1 lo hace en las células de glía que envuelven a estas sinapsis (62). Los datos obtenidos en ratones en los que se eliminaron selectivamente bien GLYT1 o bien GLYT2 indican que el primero es el encargado de retirar glicina de la hendidura sináptica hacia las células de glía, tras la liberación del neurotransmisor desde las neuronas presinápticas (63). La función de GLYT2, sin embargo, parece relacionada con el restablecimiento de los niveles de glicina en los terminales presinápticos, más que con la terminación de la neurotransmisión (64). Estos niveles de glicina en el citoplasma de los terminales son necesarios para que se vuelvan a rellenar las vesículas sinápticas a través de un transportador de baja afinidad que se localiza en dichas vesículas, y que se denomina VIAAT o GAT. Este transportador es compartido por glicina y GABA por lo que muchas terminales liberan ambos neurotransmisores inhibidores (65). Aparte de su función en la neurotransmisión glicinérgica, GLYT1 también se expre-

sa en neuronas glutamatérgicas, concentrándose tanto en los terminales presinápticos como en las densidades postsinápticas (66). Como se ha mencionado más arriba, los datos farmacológicos apoyan que esta ubicación está relacionada con la neurotransmisión glutamatérgica. De hecho estos datos farmacológicos se han visto reforzados recientemente con el uso de animales genéticamente modificados. La función glutamatérgica no queda plenamente establecida hasta la segunda-tercera semana de vida en los ratones, por lo que no pudo estudiarse inicialmente en los ratones Glyt1-/- por su muerte neonatal. Sin embargo, el ratón heterocigoto sí sobrevivió hasta la edad adulta, a pesar de poseer unos niveles de GLYT1 reducidos a la mitad. Estos ratones mostraron alteraciones en diversos tests farmacológicos, electrofisiológicos y de comportamiento compatibles con una disfunción del receptor de NMDA (67). De la misma manera, un ratón mutante condicional en el que GLYT1 se eliminó sólo en las neuronas del cerebro anterior mostraba alteraciones semejante al heterocigoto, y totalmente compatible con la saturación permanente en los mismos del sitio de unión de la glicina en el receptor de NMDA (68). Por otra parte, hay datos bioquímicos que apoyan la implicación de GLYT1 en la regulación de los receptores de NMDA ya que ambas proteínas coinmunoprecipitan, lo que indica una estrecha asociación física. Probablemente esta asociación se realiza a través de la proteínas andamiaje PSD-95, ya que tanto GLYT1 como algunas subunidades del receptor de NMDA interaccionan con los dominios PDZ de PSD-95 (69).

A pesar de que estos datos apoyan a GLYT1 como el principal regulador de la concentración de glicina en la vecindad de NMDAR, no se puede descartar que GLYT2 tenga también algún papel en las áreas en donde coexisten neuronas glicinérgicas y glutamatérgicas. De hecho de sabe que la glicina liberada desde estas neuronas puede alcanzar las sinapsis glutamatérgicas próximas por un proceso de difusión (*spill-over*), para lo que tendría que vencer de alguna manera la resistencia de los transportadores GLYT1 y GLYT2 interpuestos en el camino (70).

De la misma manera que para los transportadores de glutamato, los mecanismos reguladores de la expresión y actividad de estos transportadores no están bien definidos. Se conocen algunos factores de transcripción que afectan a la expresión de GLYT1, como los miembros de la familia HMGN3, que se expresan abundantemente en células de glía y en retina, en donde colocaliza con GLYT1 (71). Igualmente, el factor de transcripción Tsb-1 se une al menos *in vitro* al promotor del gen GLYT1 (72). En cuanto a efectores y vías de señalización que afecten a la actividad o al tráfico de GLYT1, esta proteína es inhibida

por ácido araquidónico, por zinc y por protones, efectores que también afectan a los receptores de NMDA, por lo que podrían intervenir en una regulación coordinada de ambas proteínas (73-75). Una de las vías de señalización que es activada, entre otros, por los receptores de NMDA, también afecta a GLYT1 a través de una modificación de su tráfico intracelular. La activación de PKC promueve la endocitosis de GLYT1, y esto podría incrementar los niveles de glicina en las sinapsis glutamatérgicas. Los procesos de tráfico GLYT1 también podrían ser afectados por proteínas que interaccionan con este transportador, como las proteínas con dominios PDZ. Además, el transportador está sometido a procesos de tráfico asimétrico en células polarizadas que lo concentran en los sitios en donde es relevante desde un punto de vista funcional (76). De lo anteriormente expuesto se desprende que el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la llegada de GLYT1 a las sinapsis glutamatérgicas y su interacción con NMDAR (p. ej. tráfico intracelular, reciclaje en la superficie celular e inclusión en microdominios en los que reside NMDAR) pueden ser de gran interés en la comprensión de la regulación no sólo de GLYT1 sino también de NMDAR y, por tanto, de interés en el contexto de la esquizofrenia.

Todos los datos experimentales conocidos hasta el momento parecen indicar que la función de GLYT1 está estrechamente relacionada con la de NMDAR, por lo que no es sorprendente el que este transportador se haya convertido en una diana importante para el desarrollo de fármacos antiesquizofrénicos. La idea básica de estos estudios es la de incrementar la actividad del receptor de NMDA, disminuida en los pacientes esquizofrénicos, mediante el incremento de la concentración extracelular de glicina que ha de producirse tras la inhibición del transportador. De hecho, varios estudios preclínicos recientes con los inhibidores de GLYT1 NFPS y ORG 24598 apuntan en esa dirección (24). Además, un estudio clínico con el inhibidor de GLYT1 sarcosina ha revelado una mejora sustancial tanto de los síntomas positivos como de los negativos y cognitivos de los pacientes esquizofrénicos (77).

Papel de los transportadores de baja afinidad en la regulación de la concentración de glicina y en el ciclo glutamato-glutamina (Familia SLC38)

Estudios clásicos sobre transporte de aminoácidos sugieren la existencia de otros sistemas de transporte dependientes de Na⁺ con capacidad para transportar glicina en las células nerviosas. Entre ellos se encuentra el denominado sistema A, un sistema de transporte con amplia especificidad de sustratos, ya que es capaz de transportar no sólo glicina sino también a otros aminoácidos como la alanina, la

glutamina, la prolina o la serina y al sustrato sintético ácido 2-metil amino isobutírico (MeAIB) (78). Este sistema de transporte podría jugar un papel importante en el aporte de glutamina a las neuronas como precursor de la síntesis de glutamato mediante el conocido como ciclo glutamato-glutamina entre células de glía y neuronas. En este ciclo la glutamina sintetizada en las células de glía a partir del glutamato recapturado por las mismas sería exportada al medio extracelular por otro sistema de transporte, denominado clásicamente sistema N, y finalmente la glutamina llegaría a las neuronas por la acción del sistema A (79). La naturaleza molecular de estos transportadores ha comenzado ha resolverse recientemente con el clonaje de los miembros de una familia génica ahora denominada SLC38, y que incluye a transportadores tanto del sistema A como del sistema N. Cuatro de estos transportadores, denominados SNAT1, SNAT2, SNAT3 y SNAT5 (anteriormente denominados ATA1, ATA2, SN1 y SN2, respectivamente) están enriquecidos en sistema nervioso (78, 80). Dos de ellos (SNAT1 y SNAT2) corresponden al sistema A, mientras que los otros dos (SNAT3 y SNAT5) tienen las características del sistema N. Con respecto a la estructura de estos transportadores, poco se conoce. Los gráficos de hidrofobicidad predicen 11 segmentos transmembrana, con el extremo amino intracelular y el carboxilo extracelular. Puesto que poseen secuencias consenso de glicosilación, es probable que se trate de glicoproteínas aunque estos aspectos estructurales están por comprobar experimentalmente.

De estos transportadores, SNAT2 y SNAT5 son los que mayor afinidad presentan por glicina en ensayos in vitro, y por tanto podrían estar implicados en la regulación de los niveles extracelulares de este aminoácido, aparte del papel que pudieran tener en el transporte de glutamina. Los estudios de inmunohistoquímica indican que SNAT5 es una proteína glial altamente enriquecida en el entorno de las sinapsis glutamatérgicas, una localización compatible con la hipótesis de que SNAT5 participaría en el ciclo glutamato-glutamina mediante transferencia de la glutamina glial a las neuronas glutamatérgicas y/o con una función reguladora de los niveles de glicina en el entorno de la sinapsis glutamatérgica mediante eflujo de la misma desde las células gliales (81). En cuanto al otro transportador, SNAT2, localiza principalmente en las dendritas y axones de las neuronas glutamatérgicas (82). Además de esta localización neuronal, SNAT2 se encuentra en células de glía (especialmente en la glía limitans y pies chupadores de los astrocitos) y en el endotelio vascular, en donde podría contribuir al tráfico de aminoácidos a través de la barrera hematoencefálica (82). Es de destacar que, en tejidos diferentes al cerebro, SNAT2 está fuertemente regulado, tanto en la transcripción de su mRNA como en el tráfico intracelular de la proteína. Entre estos factores reguladores se encuentra la disponibilidad de sustratos, la osmolaridad del medio o las hormonas (insulina) (78).

Recientemente se ha establecido una importante conexión entre estos transportadores y la esquizofrenia, o más concretamente con el mecanismo de acción de un fármaco empleado en el tratamiento de los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad: la clozapina. La clozapina, además de su capacidad de unión a los receptores dopaminérgicos D2 y los de 5-HT2A, potencia la actividad de los receptores de NMDA. En este estudio se demostró que la clozapina inhibe específicamente el transporte de glicina a través del sistema A a concentraciones farmacológicas (12). Con anterioridad se había demostrado que la clozapina también inhibe a GLYT1, pero lo hace a concentraciones mayores de las farmacológicamente aceptables (83). El efecto sobre el sistema A explicaría el incremento en la actividad de NMDAR por el incremento en los niveles extracelulares de glicina (54). Sin embargo, los mecanismos moleculares de acción de esta droga sobre el sistema A no se han investigado. El esclarecimiento de los mecanismos moleculares por los que actúan fármacos antipsicóticos como la clozapina sobre estos transportadores de baja afinidad podría ayudar a identificar nuevas dianas terapéuticas y al desarrollo de nuevos fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través del Ministerio de Investigación Científica e Innovación (SAF2005-03185), la Comunidad Autónoma de Madrid (S2006/SAL-0253), y una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Andreasen, N.C. (2000) Schizophrenia: fundamental questions. *Brain. Res. Rev.* 31: 106-112.
- (2) Karayiorgou, M. (2001) Genetic aspects of schizophrenia. *Clin. Neurosci. Res.* 1: 158-163.
- (3) Carlsson, A. (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1: 179-186.
- (4) JAVITT, D.C. (1987) Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J. Clin. Psichiatry*. 9: 12-35.
- (5) JAVITT, D.C. AND ZUKIN, S.R. (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*. 148: 1301-1308.
- (6) Javitt, D.C. (2007) Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Int. Rev. Neurobiol.* 78: 69-108.

- (7) LINDSLEY, C.W.; SHIPE W.D.; WOLKENBERG, S.E.; THEBERGE, C.R.; WILLIAMS, D.L.; SUR C. AND KINNEY, G.G. (2006) Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr. Topics Med. Chem.* 6: 771-785.
- (8) WATIS, L.; CHEN, S.H.; CHUA, H.C.; CHONG, S.A. AND SIM, K. (2008) Glutamatergic abnormalities of the thalamus in schizophrenia: a systematic review. *J. Neural. Transm.* 115: 493-511.
- (9) MILLAN, M.J. (2005) N-methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacol*. 179: 30-53.
- (10) OLNEY, J.W.; NEWCOMER, J.W. AND FARBER, N.B. (1999) NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 33: 523-533.
- (11) Moghaddam, B. (2003) Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron.* 40: 881-884.
- (12) JAVITT, D.C. (2004) Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry*. 9: 984-997.
- (13) Lechner, S.M. (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: inhibitors of glycine transport. *Curr. Op. Pharmacol.* 6: 75-81.
- (14) Thomsen, C. (2006) Glycine transporter inhibitors as novel antipsychotics. *Drug Discovery: Therapeutic Strategies*. 3: 539-545.
- (15) Sur, C. and Kinney, G.G. (2007) Glycine transporter 1 inhibitors and modulation of NMDA receptor-mediated excitatory neurotransmission. *Curr. Drug Targ.* 8: 643-649.
- (16) Mori, H. and Mishina, M. (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*. 34: 1219-1237.
- (17) DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D. AND TRAYNELIS, S.F. (1999) The glutamate receptors ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51: 7-61.
- (18) Zukin, R.S. and Bennet, M.V.L. (1995) Alternative spliced isoformas of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* 18: 306-313.
- (19) Cull-Candy, S.; Brickley, S. and Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 327-333.
- (20) Westergren I.; Nystrom, B.; Hamberger, A.; Nordborg, C. and Johansson, B.B. (1994) Concentrations of amino acids in extracellular fluid after opening of the bloodbrain barrier by intracarotid infusion of protamine sulfate. *J. Neurochem.* 62:159-165.
- (21) Bergeron, R.; Meyer, T.M.; Coyle, J.T. and Green R.W. (1998) Modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 15730-15734.

HIPÓTESIS GLUTAMATÉRGICA DE LA ESQUIZOFRENIA

- (22) BERGER, A.J.; DIEUDONNE, S. AND ASCHER, P. (1998) Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. *J. Neurophysiol.* 80: 3336-33340.
- (23) Chen, L.; Muhlhauser, M. and Yang, C.R. (2003) Glycine transporter 1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *J. Neurophysiol.* 89: 691-703.
- (24) Kinney, G.G.; Sur, C.; Burno, M.; Mallorga, P.J.; Williams, B.; Figueroa, D.J.; Wittmann, M.; Lemaire, W. and Conn, P.J. (2003) The glycine transporter type 1 inhibitor N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarcosine potentiates NMDA receptor-mediated responses in vivo and produces an antipsychotic profile in rodent behaviour. *J. Neurosci.* 23:7586-7591.
- (25) ZUKIN, R.S. AND LAU, C.G. (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Rev. Neurosci.* 8: 413-426.
- (26) Tomita, S.; Nicoll, R.A. and Bredt, D.S. (2001) PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J. Cell. Biol.* 153: F19-24.
- (27) CEPEDA, C. AND LEVINE, M.S. (1998) Dopamine and N-methyl-D-aspartate receptor interactions in the neostriatum. *Dev. Neurosci.* 20: 1-18.
- (28) Kanai, Y. and Hediger, M.A. (2004) The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.* 447: 469-479.
- (29) Yernool, D.; Boudker, O.; Jin, Y. and Gouaux, E. (2004) Structure of a glutamate transporter homologue from Pyrococcus horikoshii. *Nature*. 431: 811-818.
- (30) Lehre, K.P.; Levy, L.M.; Ottersen, O.P.; Storm-Mathisen, J. and Danbolt, N.C. (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 15: 1835-1853.
- (31) Chen, W.; Mahadomrongkul, V.; Berger, U.V.; Bassan, M.; Desilva, T.; Tanaka, K.; Irwin, N.; Aoki, C. and Rosenberg, P.A. (2004) The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24: 1136-1148.
- (32) Rothstein, J.D.; Martin, L.; Levey, A.I.; Dykes-Hoberg, M.; Jin, L.; Wu, D.; Nash, N. and Kuncl, R.W. (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*. 13: 713-725.
- (33) FURUTA, A.; ROTHSTEIN, J.D. AND MARTIN, L.J. (1997) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 17: 8363-8375.
- (34) Wersinger, E.; Schwab, Y.; Sahel, J. A.; Rendon, A.; Pow, D.V.; Picaud, S. and Roux, M.J. (2006) The glutamate transporter EAAT5 works as a presynaptic receptor in mouse rod bipolar cells. *J. Physiol.* 577: 221-234.

- (35) TANAKA, K.; WATASE, K.; MANABE, T.; YAMADA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, K.; IWAMA, H.; NISHIKAWA, T.; ICHIHARA, N.; KIKUCHI, T.; OKUYAMA, S.; KAWASHIMA, N.; HORI, S.; TAKIMOTO, M. AND WADA, K. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 276: 1699-1702.
- (36) Bristol, L.A. and Rothstein, J.D. (1996) Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann. Neurol.* 39: 676-679.
- (37) WATASE, K.; HASHIMOTO, K.; KANO, M.; YAMADA, K.; WATANBE, M.; INOUE, Y.; OKUYAMA, S.; SAKAGAWA, T.; OGAWA, S.; KAWASHIMA, N.; HORI, S.; TAKIMOTO, M.; WADA, K. AND TANAKA, K. (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 10: 976-988.
- (38) Rothstein, J.D.; Dykes-Hoberg, M.; Pardo, C.A.; Bristol, L.A.; Jin, L.; Kuncl, R.W.; Kanai, Y.; Hediger, M.A.; Wang, Y.; Schielke, J.P. and Welty, D.F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 16: 675-686.
- (39) AOYAMA, K.; SUH, S.W.; HAMBY, A.M.; LIU, J.; CHAN, W.Y.; CHEN, Y. AND SWAN-SON, R.A. (2006) Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat. Neurosci.* 9: 119-26.
- (40) Huang, Y.H.; Dykes-Hoberg, M.; Tanaka, K.; Rothstein, J.D. and Bergles, D.E. (2004) Climbing fibre activation of EAAT4 transporters and kainate receptors in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 24: 103-111.
- (41) NIKKUNI, O.; TAKAYASU, Y.; IINO, M.; TANAKA, K. AND OZAWA, S. (2007) Facilitated activation of metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells in glutamate transporter EAAT4-deficient mice. *Neurosci. Res.* 59: 296-303.
- (42) ROBINSON, M.B. (2006) Acute regulation of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on constitutive and regulated trafficking. *Handb. Exp. Pharmacol.* 175:251-275.
- (43) Trotti, D.; Danbolt, N.C. and Volterra, A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 328-334.
- (44) KALANDADZE A.; Wu Y. AND ROBINSON, M.B. (2002) Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J. Biol. Chem.* 277: 45741-45750.
- (45) BOEHMER, C.; PALMADA, M.; RAJAMANICKAM, J.; SCHNIEPP, R.; AMARA, S. AND LANG, F. (2006) Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J. Neurochem.* 97: 911-921.
- (46) Susarla, B.T. and Robinson, M.B. (2008) Internalization and degradation of the glutamate transporter GLT-1 in response to phorbol ester. *Neurochem. In.t* 52: 709-722.

HIPÓTESIS GLUTAMATÉRGICA DE LA ESQUIZOFRENIA

- (47) Gonzalez-Gonzalez, I.M.; Garcia-Tardon N.; Gimenez, C. and Zafra, F. (2008) PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster. *Glia* 56: 963-974.
- (48) Gonzalez-Gonzalez, I.M.; Garcia-Tardon, N.; Cubelos, B.; Gimenez, C. and Zafra, F. (2008) The glutamate transporter GLT1b interacts with the scaffold protein PSD-95. *J. Neurochem.* 105: 1834-1848.
- (49) MATUTE, C.; MELONE, M.; VALLEJO-ILLARMENDI, A. AND CONTI, F. (2005) Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia*. 49: 451-455.
- (50) Melone, M.; Vitellaro-Zuccarello, L.; Vallejo-Illarramendi, A.; Perez-Samartin, A.; Matute, C.; Cozzi, A.; Pellegrini-Giampietro, D.E.; Rothstein, J.D. and Conti, F. (2001) The expression of glutamate transporter GLT-1 in the rat cerebral cortex is down-regulated by the antipsychotic drug clozapine. *Mol. Psychiatry*. 6: 380-386.
- (51) EGAN, M.F.; STRAUB, R.E.; GOLDBERG, T.E.; YAKUB, I.; CALLICOTT, J.H.; HARIRI, A.R.; MATTAY, V.S.; BERTOLINO, A.; HYDE, T.M.; SHANNON-WEICKERT, C.; AKIL, M.; CROOK, J.; VAKKALANKA, R.K.; BALKISSOON, R.; GIBBS, R.A.; KLEINMAN, J.E. AND WEINBERGER, D.R. (2004) Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 12604-12609.
- (52) Homayoun, H. and Moghaddam, B. (2007) NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 27: 11496-11500.
- (53) Betz, H.; Gomeza, J.; Armsen, W.; Scholze P. and Eulenburg, V. (2006) Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 55-58.
- (54) JAVITT, D.C.; DUNCAN, L.; BALLA, A. AND SERSHEN, H. (2005) Inhibition of system A-mediated glycine transport in cortical synaptosomes by therapeutic concentrations of clozapine: implications for mechanisms of action. *Mol. Psychiatry*. 10: 275-287.
- (55) LIU Q.R.; LOPEZ-CORCUERA, B.; MANDIYAN, S.; NELSON, H. AND NELSON, N. (1993) Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J. Biol. Chem.* 268: 22802-22808.
- (56) Lindsley, C.W.; Shipe, W.D.; Wolkenberg, S.E.; Theberge, C.R.; Williams, D.L. Jr.; Sur, C. and Kinney, G.G. (2006): Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr. Top. Med. Chem.* 6: 771-785.
- (57) Chen, N.H.; Reith, M. E. and Quick, M.W. (2004) Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch.* 447: 519-531.

- (58) Yamashita, A.; Singh, S.K.; Kawate, T.; Jin, Y. and Gouaux, E. (2005) Crystal structure of a bacterial homologue of Na+/Cl—dependent neurotransmitter transporters. *Nature*. 437: 215-223.
- (59) VANDENBERG, R.J.; SHADDICK, K. AND JU, P. (2007) Molecular basis for substrate discrimination by glycine transporters. *J. Biol. Chem.* 282: 14447-14453.
- (60) ZOMOT, E.; BENDAHAN, A.; QUICK, M.; ZHAO, Y.; JAVITCH, J.A. AND KANNER, B.I. (2007) Mechanism of chloride interaction with neurotransmitter:sodium symporters. *Nature*. 449: 726-730.
- (61) Forrest, L.R.; Tavoulari, S.; Zhang, Y.W.; Rudnick, G. and Honig, G. B. (2007) Identification of a chloride ion binding site in Na+/Cl -dependent transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 104: 12761-12766.
- (62) ZAFRA, F.; ARAGON, C.; OLIVARES, L.; DANBOLT, N.C.; GIMENEZ, C. AND STORM-MATHISEN, J. (1995) Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J. Neurosci.* 15: 3952-3969.
- (63) Gomeza, J.; Hulsmann, S.; Ohno, K.; Eulenburg V.; Szoke, K.; Richter, D. and Betz, H. (2003) Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron*. 40: 785-796.
- (64) GOMEZA, J.; OHNO, K.; HULSMANN, S.; ARMSEN, W.; EULENBURG V.; RICHTER, D.W.; LAUBE, B. AND BETZ, H. (2003) Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron*. 40: 797-806.
- (65) Wojcik S.M.; Katsurabayashi, S.; Guillemin, I.; Friauf, E.; Rosenmund, C.; Brose, N. and Rhee, J.S. (2006) A shared vesicular carrier allows synaptic co-release of GABA and glycine. *Neuron*. 50: 575-587.
- (66) Cubelos, B.; Gimenez, C. and Zafra, F. (2005) Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb. Cortex*. 15: 448-459.
- (67) Tsai, G.; Ralph-Williams, R.J.; Martina, M.; Bergerson, R.; Berger-Sweeney, J.; Dunham, K.S.; Jiang, Z.; Caine, S.B. and Coyle, J.T. (2004) Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 8485-8490.
- (68) YEE, B.K.; BALIC, E.; SINGER, P.; SCHWERDEL, C.; GRAMPP, T.; GABERNET, L.; KNUESEL, I.; BENKE, D.; FELDON, J.; MOHLER, H. AND BOISON, N D. (2006) Disruption of glycine transporter 1 restricted to forebrain neurons is associated with a procognitive and antipsychotic phenotypic profile. *J. Neurosci.* 26: 3169-3181.
- (69) Cubelos, B.; GonzalezZ-Gonzalez, I.M.; Gimenez, C. and Zafra, F. (2005) The scaffolding protein PSD-95 interacts with the glycine transporter GLYT1 and impairs its internalization. *J. Neurochem.* 95: 1047-1058.

HIPÓTESIS GLUTAMATÉRGICA DE LA ESQUIZOFRENIA

- (70) AHMADI, S.; MUTH-SELBACH, U.; LAUTERBACH, A.; LIPFERT, P.; NEUHUBER, W.L. AND ZEILHOFER, H.U. (2003) Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. *Science*. 300: 2094-2097.
- (71) West, K.L.; Castellini, M.A.; Duncan, M.K. and Bustin, M. (2004) Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Mol. Cell. Biol.* 24: 3747-3756.
- (72) Wang, T. F.; Ding, C. N.; Wang, G. S.; Luo, S. C.; Lin, Y. L.; Ruan, Y.; Hevner, R.; Rubenstein, J.L. and Hsueh, Y.P. (2004) Identification of Tbr-1/CASK complex target genes in neurons. *J. Neurochem.* 91: 1483-1492.
- (73) PEARLMAN, R.J.; AUBREY, K.R. AND VANDENBERG R.J. (2003) Arachidonic acid and anandamide have opposite modulatory actions at the glycine transporter, GLYT1a. *J. Neurochem.* 84: 592-601.
- (74) Ju, P.; Aubrey, K.R. and Vandenberg, R.J. (2004) Zn2+ inhibits glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *J. Biol. Chem.* 279: 22983-22991.
- (75) Aubrey, K.R.; Mitrovic, A.D. and Vandenberg, R.J. (2000) Molecular basis for proton regulation of glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *Mol. Pharmacol.* 58: 129-135.
- (76) POYATOS, I.; RUBERTI, F.; MARTINEZ-MAZA, R.; GIMENEZ, C.; DOTTI, C.G. AND ZAFRA, F. (2000) Polarized distribution of glycine transporter isoforms in epithelial and neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 15: 99-111.
- (77) TSAI, G.; LANE, H.Y.; YANG, P.; CHONG, M.Y. AND LANGE, N. (2004) Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 55: 452-456.
- (78) MacKenzie, B. and Erickson, J.D. (2004) Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch*. 447: 784-795.
- (79) Broer, S. and Brookes, N. (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* 77: 705-719.
- (80) Chaudhry, F.A.; Schmitz, D.; Reimer, R.J.; Larsson, P.; Gray, A.T.; Nicoll, R.; Kavanaugh, M. and Edwards, R.H. (2002) Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system a transporters. *J. Neurosci.* 22: 62-72.
- (81) Cubelos, B.; Gonzalez-Gonzalez, I.M.; Gimenez, C. and Zafra, F. (2005) Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia*. 49: 230-244.
- (82) Gonzalez-Gonzalez, I.M.; Cubelos, B.; Gimenez, C. and Zafra, F. (2005) Immunohistochemical localization of the amino acid transporter SNAT2 in the rat brain. *Neuroscience*. 130: 61-73.

(83) Williams, J.B.; Mallorga, P.J.; Jeffrey Conn, P.; Pettibone, D.J. and Sur, C. (2004) Effects of typical and atypical antipsychotics on human glycine transporters. *Schizophr. Res.* 71: 103-112.

11. Enfermedad de Lafora: epilepsia y regulación del metabolismo de glucógeno por laforina y malina

DAVID VÍLCHEZ, SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA Y JOAN J. GUINOVART

RESUMEN

Normalmente las neuronas no almacenan glucógeno. Sin embargo, en determinadas patologías acumulan unas inclusiones formadas principalmente por polímeros de glucosa poco ramificados que podrían ser considerados moléculas de glucógeno aberrantes. El caso más impactante es el de la enfermedad de Lafora, una patología neurodegenerativa y con dramáticas consecuencias. La enfermedad se asocia con alteraciones en dos proteínas, laforina y malina. Por este motivo analizamos la capacidad de las neuronas para sintetizar glucógeno, las consecuencias de su acumulación en estas células y la función de laforina y malina. Mostramos que las neuronas poseen la maquinaria para sintetizar glucógeno ya que expresan la isoforma muscular de la glucógeno sintasa (MGS). Sin embargo, esta enzima se encuentra altamente fosforilada, por lo que se mantiene inactiva. No obstante, el incremento de los niveles de PTG, una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 que le permite interaccionar con MGS y estimular su desfosforilación, induce la síntesis de glucógeno en neuronas. Sorprendentemente, estas células entran en apoptosis cuando acumulan glucógeno. Por otra parte, la formación de un complejo entre laforina y malina, estimula la degradación a través del sistema ubiquitina-proteasoma de MGS y PTG lo que contribuye a asegurar el silenciamiento de la síntesis de glucógeno. Nuestros resultados ofrecen una explicación a la acumulación de polímeros de glucosa en la enfermedad de Lafora al demostrar una función crucial de laforina y malina en la regulación de la síntesis de glucógeno.

Palabras clave: Neurodegeneración. Apoptosis. Cuerpos de poliglucosano. Glucógeno sintasa. Proteasoma.

ABSTRACT

Lafora disease: epilepsy and glycogen metabolism control by laforin and malin

Glycogen deposition is normally absent in neurons. However, inclusion bodies resembling abnormal glycogen accumulate in several neurological diseases, particularly in Lafora disease, a neurodegenerative disorder that results in progressive myoclonus epilepsy and death. Lafora disease is caused by mutations in either malin or laforin. On the basis of this observation, we analyzed the capacity of neurons to synthesize glycogen, the consequences of glycogen accumulation for these cells and the role of laforin and malin. Here we show that mouse neurons have the enzymatic machinery for synthesizing glycogen but that it is suppressed by retention of muscle glycogen synthase (MGS) in the phosphorylated, inactive state. However, overexpression of PTG, which brings protein phosphatase 1 to MGS for activation, markedly increases glycogen accumulation. Surprisingly, glycogen accumulation induces apoptosis in neurons. This suppression is further ensured by a complex of laforin and malin. The laforin-malin complex causes proteasome-dependent degradation of both PTG and MGS, thereby ensuring a blockade of neuronal glycogen synthesis even under intense glycogenic conditions. Here we explain the formation of polyglucosan inclusions in Lafora disease by demonstrating a crucial role for laforin and malin in glycogen synthesis.

Keywords: Neurodegeneration. Apoptosis. Polyglucosan bodies. Glycogen synthase. Proteasome.

Abreviaturas: MGS, Glucógeno sintasa muscular; PTG, Protein targeting to glycogen; ATP, Adenosina 5'-trifosfato; PAS, Periodic-acid Schiff; PGBs, Cuerpos de poliglucosano (Polyglucosan Bodies); EPM2A, Epilepsy of progressive myoclonus type2 gene A; EPM2B, Epilepsy of progressive myoclonus type2 gene B; GS, Glucógeno sintasa; RT-PCR, Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa; LGS, Glucógeno sintasa hepática; GFAP, Proteína fibrilar acídica de la glía; GP, Glucógeno fosforilasa; G6P, Glucosa 6-fosfato; GK, Glucoquinasa; HKI, Hexoquinasa I; GSK3, Glucógeno sintasa quinasa 3; AMPK, Quinasa estimulada por AMP; PP1, Proteína fosfatasa de tipo 1; N2a, Neuro2a; siRNA, Oligonucléotidos de RNA de interferencia; GFP, Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein); AdCMV-GK, Adenovirus recombinante que codifica para la HKI de rata; MOI, Multiplicidad de infección; AdCMV-MGS, Adenovirus recombinante que codifica para la MGS humana; AdCMV-GFP-MGS, Adenovirus recombinante que codifica para la PTG de ratón fusionada a GFP; AdCMV-PTG, Adenovirus recombinante que codifica para la PTG de ratón fusionada a GFP; AdCMV-GFP, Adenovirus recombinante que codifica para la PTG de ratón fusionada a GFP; AdCMV-GFP, Adenovirus recombinante que codifica para la PTG de ratón fusionada a GFP; AdCMV-GFP, Adenovirus recombinante que codifica para la PTG de ratón fusionada a GFP; AdCMV-GFP, Adenovirus recombinante que codifica para la PTG de ratón fusionada a GFP; AdCMV-GFP, Adenovirus recombinante que codifica para la laforina humana; AdCMV-malina,

El cerebro de los mamíferos contiene glucógeno pero a unas concentraciones muy inferiores a las que se encuentran en otros tejidos como el hígado o el músculo esquelético. De hecho, la proporción de glucógeno entre hígado/músculo esquelético/cerebro es de 100:10:1 (1). Además, el glucógeno cerebral se halla casi exclusivamente en los astrocitos, mientras que las neuronas no lo acumulan (2-4).

Se acepta generalmente que el sistema nervioso central es dependiente de la glucosa como sustrato energético y que se encuentra a merced de la circulación sistémica para obtener una entrega de glucosa constante e interrumpida (5-7) ya que el glucógeno contenido en el cerebro bastaría sólo para unos pocos minutos. Aunque la función fisiológica de este glucógeno no ha sido del todo aclarada, se le han asignado dos importantes funciones como suministrador de sustratos energéticos en el cerebro: 1) bajo condiciones hipoglucémicas cuando el suministro de glucosa es insuficiente para afrontar los requerimientos inmediatos de energía (2, 3, 8, 9), y 2) durante periodos de incremento transitorio de la demanda energética, en los que la glucosa que llega por la circulación sistémica es insuficiente (2, 3, 8). Se acepta que, en estas condiciones, el glucógeno de los astrocitos suministraría a las neuronas un sustrato energético suplementario a la glucosa. Toda una serie de observaciones han permitido llegar a esta conclusión: el contenido de glucógeno en el cerebro incrementa durante el sueño (10, 11) y la anestesia (1, 12, 13), con la consiguiente movilización de este polisacárido al despertar o volver a estar consciente. También se ha observado que la estimulación del cerebro induce glucogenolisis, hecho que relaciona la actividad fisiológica neuronal con la utilización de glucógeno (14, 15). Esta glucogenolisis tiene lugar durante períodos de incrementada demanda energética del cerebro incluso en condiciones de normoglicemia (8).

El metabolismo del glucógeno cerebral es un claro ejemplo del acoplamiento entre neuronas y glía. Los neurotransmisores y neuromoduladores movilizan las reservas del polisacárido de los astrocitos (2, 8, 16, 17). Varias observaciones contribuyen a pensar que éste da lugar a lactato que es exportado al espacio extracelular de donde es captado por las neuronas para ser utilizado como combustible aeróbico durante períodos de incrementada actividad axonal (2, 18, 19). Así, las neuronas son capaces de funcionar si la glucosa es substituida por el

Adenovirus recombinante que codifica para la malina humana de tipo salvaje fusionada al epítopo de hemaglutinina (HA); **AdCMV-malina-D146N**, Adenovirus recombinante que codifica para la malina humana mutante D146N fusionada HA; **GAPDH**, Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; **SP**, Estaurosporina.

lactato como combustible (20, 21) y el glucógeno de los astrocitos se moviliza rápidamente durante la hipoglucemia y aparece principalmente como lactato extracelular (18). Además, el bloqueo de la degradación del glucógeno de los astrocitos o del transporte de lactato de estas células a los axones reduce de manera acelerada la actividad neuronal (22).

Por lo tanto, a pesar de que las neuronas no acumulan glucógeno, sí se benefician de las reservas almacenadas en los astrocitos. Esta característica hace aún más intrigante el hecho de que en determinadas patologías neurológicas se acumulen polímeros de glucosa en las neuronas. Tal es el caso de la enfermedad de Lafora, que fue descrita en 1911 por el español Gonzalo Rodríguez Lafora (23-25), discípulo de Santiago Ramón y Cajal. La enfermedad se caracteriza por la presencia de unas inclusiones en el soma neuronal, en dendritas y en las neuritas corticales que han sido denominadas cuerpos de Lafora. Estos agregados se tiñen intensamente con la técnica PAS, lo que indica un contenido importante de carbohidratos. Estudios bioquímicos han mostrado que los cuerpos de Lafora se componen principalmente de polímeros de glucosa pobremente ramificados (PGBs), es decir, que podrían ser considerados glucógeno aberrante ya que no presentan el patrón de ramificación característico de este polisacárido (26-29). Los cuerpos de Lafora también contienen hasta un 6% de proteína no caracterizada (26, 29). Estas inclusiones son un signo patognómico de la enfermedad y podrían ser su causa. Además, también se ha detectado la presencia de los cuerpos de Lafora en otros órganos como el hígado, músculo, corazón, retina y piel (30, 39), siendo más abundantes en los órganos con un mayor metabolismo de la glucosa, es decir, en el cerebro, corazón, hígado y músculo esquelético (39).

La enfermedad de Lafora es una patología neurodegenerativa fatal y es la causa más frecuente de epilepsia progresiva mioclónica en los países del sur de Europa. La enfermedad se inicia, en la mayoría de los casos, entre los 10 y 17 años de edad, típicamente con crisis generalizadas tónico-clónicas o crisis visuales que suelen describirse como visión de luces o estrellas (35, 37, 39, 40). Poco después el paciente presenta crisis mioclónicas, rasgo fundamental de la enfermedad.

La enfermedad de Lafora presenta un proceso de neurodegeneración progresiva. En la autopsia se observa una abundante pérdida de neuronas sin desmielinización ni inflamación. Todas las regiones del sistema nervioso central se ven involucradas en este proceso, aunque en diferentes grados. Éstas incluyen la corteza cerebral y cerebelosa, los ganglios basales, los núcleos del cerebelo, el tálamo y el hipocampo. Además, también se observa neurodegeneración en la retina (39, 41, 42). Como consecuencia aparece una demencia rápidamente

progresiva poco tiempo después del comienzo de las crisis tónico-clónicas y las mioclonías. Otras manifestaciones neurológicas que el paciente presenta a lo largo del curso de la enfermedad son ataxia, y neuropatía y miopatía periféricas (39, 43). A medida que la enfermedad avanza, la mayoría de los pacientes acaban presentando mioclonías continuas y evolucionan a un estado vegetativo terminal en el que deben ser alimentados por sonda. La mayoría de los enfermos fallecen antes de 10 años después del comienzo de la enfermedad, normalmente por complicaciones debidas a la degeneración del sistema nervioso y al estado epiléptico (35, 39, 40).

La enfermedad de Lafora se hereda siguiendo un patrón autosómico recesivo y muestra heterogeneidad genética. Al menos dos loci son responsables de esta enfermedad: EPM2A (*epilepsy of progressive myoclonus type2 gene A*) y EPM2B (*epilepsy of progressive myoclonus type2 gene B*). Mutaciones en EPM2A son responsables de aproximadamente el 48% de los casos mientras que otro 40% se debe a mutaciones en EPM2B. Además, la enfermedad se caracteriza por una elevada heterogeneidad alélica ya que se han identificado un gran número de mutaciones, en ambos genes, que dan lugar a la enfermedad. A pesar de ello, tanto los pacientes con mutaciones en EPM2A como en EPM2B presentan manifestaciones clínicas similares (44-46), aunque estos últimos tienden a vivir más tiempo que aquellos con defectos en EPM2A (45). Se ha postulado que un tercer gen, todavía desconocido, sería responsable de un pequeño porcentaje de los pacientes de Lafora (47).

EPM2A fue el primer gen identificado como responsable de la enfermedad de Lafora (48, 49). El gen EPM2A está organizado en 4 exones y codifica una proteína de 331 aminoácidos, denominada laforina, que presenta en la región Cterminal un dominio proteín-fosfatasa dual (HCXXGXXRS/T). Por consiguiente, la laforina recombinante puede hidrolizar in vitro sustratos de fosfo-tirosina y fosfo-serina/treonina (50, 51). La región N-terminal de laforina contiene un dominio de unión a carbohidratos (35, 52), que promueve su unión a glucógeno tanto in vitro (43) como in vivo (51). Recientemente, se ha descrito la capacidad de laforina para desfosforilar carbohidratos tales como la amilopectina o el glucógeno (53, 54). Además, se ha demostrado mediante ensayos de doble híbrido en levaduras que laforina interacciona con ella misma y con PTG (55). Todos estos datos situaban a laforina en el contexto de un complejo multiproteico asociado con las partículas de glucógeno intracelulares junto con las proteínas clásicas del metabolismo de este polisacárido y sugería que la laforina podría estar implicada en la regulación del metabolismo del glucógeno, quizás promoviendo una adecuada síntesis de este polisacárido o eliminando el glucógeno aberrante.

El segundo gen asociado a la enfermedad identificado fue EPM2B (56, 57). El gen EPM2B, que posee un sólo exón, codifica una proteína de 395 aminoácidos, denominada malina. Esta proteína tiene un dominio de dedos de zinc del tipo RING-HC (58). La presencia de dedos de zinc RING es característica de una clase de E3 ubiquitin-ligasas (58, 59). La modificación de proteínas por ubiquitina ocurre mediante un proceso de tres pasos en el cual la ubiquitina es activada y transferida desde la enzima activadora (E1) a la enzima conjugadora (E2) y, finalmente, a un sustrato con la implicación de una ubiquitina ligasa (E3) (60). Lo más frecuente es que la ubiquitinización de una proteína la lleve a su degradación por el proteasoma, pero alternativamente, la ubiquitinización puede cambiar su actividad, capacidad de interacción o su localización (59, 61). La actividad E3 ubiquitina ligasa de malina fue confirmada en varios trabajos publicados posteriormente a la secuenciación del gen (62, 63). Además, se identificaron seis dominios repetidos NHL (57). Estos dominios están implicados en la interacción proteína-proteína.

Uno de los descubrimientos clave fue que los dominios NHL de malina le permiten interaccionar con laforina (62). La interacción de malina con laforina estimula la ubiquitinización de esta última, conduciéndola a su degradación (62). Por lo tanto, una de las funciones críticas de malina consiste en regular los niveles intracelulares de laforina a través de su degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma. Aunque estos resultados mostraban, por primera vez, una relación e interacción entre dos de las proteínas cuyas alteraciones dan lugar a la patología, la degradación de laforina por la formación de un complejo con malina parecía estar en conflicto con la genética de la enfermedad de Lafora, dado que mutaciones recesivas tanto en un gen como en el otro causan la patología.

A pesar de todos estos avances, se desconocían los mecanismos moleculares por los que mutaciones en estos genes dan lugar a la enfermedad de Lafora y la función celular que desempeñan ambas proteínas. Además, desde la descripción original de la enfermedad, en el ya lejano 1911, continuaba siendo un reto el origen de los cuerpos de Lafora. El que estén formados principalmente por polímeros de glucosa sugería que podían originarse por un defecto en el metabolismo del glucógeno, porque no hay otra fuente de polímeros de glucosa en los tejidos animales. La presencia de los cuerpos de Lafora sugería la existencia de una vía bioquímica, relacionada con el metabolismo del glucógeno, cuya desregulación resultaría en la producción de acumulaciones celulares de polímeros de glucosa poco ramificados. En esta vía podrían estar implicadas laforina y malina. Tal como hemos comentado anteriormente, las neuronas evitan la

acumulación intracelular de este polisacárido, a pesar de que a simple vista podría reportarles grandes beneficios, aunque sí se detecta en determinadas enfermedades neurológicas.

La única proteína capaz de formar polímeros de glucosa en mamíferos es la glucógeno sintasa (GS), enzima sometida a complejos mecanismos de regulación. Por lo tanto, el primer objetivo era estudiar su expresión y regulación en neuronas.

Primero, mediante la técnica cualitativa RT-PCR, pusimos de manifiesto que en cerebro se expresa la isoforma muscular de GS (MGS) pero no la isoforma hepática (LGS) (Figura 1a). Mediante la técnica de *western blot*, usando anticuerpos específicos, pudimos detectar MGS pero no LGS (Figura 1b). Estos datos muestran que en el sistema nervioso central se expresa GS, concretamente, la isoforma muscular. Sin embargo, para conocer si las neuronas expresan MGS, era necesario realizar un estudio más específico en cultivos que sólo contuvieran estas células. Preparamos cultivos que no mostraban expresión de la proteína fibrilar acídica de la glía (GFAP), proteína específica de este tipo celular, por lo que estaban libres de contaminación por astrocitos. Mediante RT-PCR y *western blot*, observábamos que las neuronas expresaban MGS (Figura 1c, d). También pudimos comprobar que las neuronas no expresan la glucógeno fosoforilasa (GP), la enzima responsable de la degradación del glucógeno (Figura 1d).

A pesar de expresar MGS, las neuronas no acumulaban glucógeno, ni tan solo cuando eran cultivadas en presencia de altas concentraciones de glucosa (30 mM) (Figura 1e). En cambio, los cultivos primarios de astrocitos cultivados en las mismas condiciones, acumulaban cantidades significativas del polisacárido (Figura 1e).

La incapacidad de las neuronas para acumular glucógeno podría explicarse por unos niveles insuficientes de glucosa-6-fosfato (G6P) intracelular. Este metabolito no es tan solo un precursor de la UDP-Glucosa, sustrato de la GS, sino que es clave en el proceso de activación de esta enzima. Además de causar la activación alostérica de GS, promueve también su activación covalente al incrementar la susceptibilidad de la enzima a su desfosforilación por fosfatasas (64-67). La sobreexpresión de glucoquinasa (hexoquinasa IV (GK)) y hexoquinasa I (HKI) en neuronas, utilizando adenovirus recombinantes, nos permitió incrementar los niveles intracelulares de G6P. No obstante, un incremento de 5 veces en los niveles del metabolito (Figura 2a) no conseguía incrementar los niveles de glucógeno (Figura 2a) en estas células. Estos resultados indican que la falta de acumulación de glucógeno en neuronas no es debida a un bajo contenido de G6P.

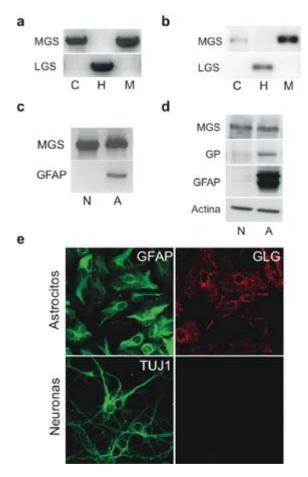


FIGURA 1. Las neuronas expresan MGS, pero no acumulan glucógeno. (a) Análisis mediante RT-PCR de la expresión de MGS y LGS en cerebro (C), hígado (H) y músculo (M) de ratón. (b) Análisis mediante western blot de la expresión de MGS y LGS en cerebro (C), hígado (H) y músculo (M) de ratón. (c) Análisis mediante RT-PCR de la expresión de MGS y LGS en cultivos primarios de neuronas (N) y astrocitos (A) de ratón. Utilizamos GFAP como marcador de astrocitos. (d) Análisis mediante western blot de la expresión de MGS en homogenizados de cultivos primarios de neuronas y astrocitos. La señal de GP y GFAP era prácticamente indetectable en cultivos de neuronas. Utilizábamos actina como control de carga. (e) Análisis mediante inmunofluorescencia, en cultivos primarios de astrocitos y de neuronas, de la acumulación de glucógeno utilizando un anticuerpo contra este polisacárido (GLG). Como marcadores de astrocitos y neuronas utilizamos GFAP y β-III-tubulina (TUJ1), respectivamente.

Otra posible explicación sería que los niveles de MGS no fueran suficientes. Por ese motivo, sobreexpresamos dicha enzima en estas células mediante adenovirus recombinantes. A pesar de aumentar drásticamente (más de 12 ve-

ces) el contenido de MGS, no observábamos ningún cambio en la síntesis de glucógeno (Figura 2b). En otros tipos celulares, aumentos menores de los niveles de MGS suponen un incremento en la acumulación de glucógeno (65).

La actividad de la GS se regula mediante fosforilación y desfosforilación. La fosforilación en múltiples residuos de serina (Ser) cerca de los extremos N-y C-terminales (68) genera formas menos activas. Varias quinasas están implicadas en este proceso entre las que destacan GSK3 que fosforila las Ser640, Ser644, Ser448 y Ser652 o AMPK que fosforila la Ser7. El análisis por *western blot* mostró que la MGS en neuronas está altamente fosforilada en los residuos Ser640 y Ser7/10, precisamente los sitios cuya fosforilación desempeña un papel más importante en la actividad de la enzima (68) (Figura 2c, d). Ello mantenía a la enzima inactivada y, por lo tanto, silenciado el proceso de síntesis de glucógeno.

La MGS expresada en neuronas se encontraba principalmente localizada en el núcleo (Figura 2e, panel de arriba). Dicha situación sólo se observa en otros tipos celulares cuando se encuentran completamente deplecionados de reservas de glucógeno. Sorprendentemente, en neuronas la MGS muestra esta distribución incluso cuando cultivamos estas células en presencia de altas concentraciones de glucosa (30 mM). En cambio, la mayoría de astrocitos no presentaban tinción nuclear de MGS. Ahí, la enzima se agrupaba en puntos discretos en el citoplasma, distribución característica de esta proteína bajo condiciones de síntesis activa de glucógeno (Figura 2e, panel de abajo).

A pesar de estar altamente inactivada, mediante el tratamiento de las neuronas con LiCl, un inhibidor de GSK3 (69), se consiguió la activación de la enzima. En estas condiciones las neuronas acumulaban glucógeno (Figura 2e, panel central) y se observaba un desfosforilación moderada de la Ser640 (Figura 2d). La MGS alteraba su localización subcelular y se acumulaba en sitios específicos del citoplasma, coincidiendo con las partículas de glucógeno crecientes (Figura 2e, panel central).

Un mecanismo más efectivo para lograr la activación de MGS requiere su desfosforilación intensiva mediante la proteína fosfatasa 1 (PP1) (70). Esta fosfatasa está implicada en la regulación de diversos procesos celulares. Por este motivo, juegan un importante papel sus subunidades reguladoras, que le confieren especificidad de sustrato (70). Se ha descrito una familia de proteínas que dirigen PP1 hacia la molécula de glucógeno. Una de ellas es la PTG (71) que se expresa en cerebro (72). PTG forma complejos entre PP1 y sus sustratos y actúa como un «andamio» molecular ensamblando PP1 con sus sustratos en las

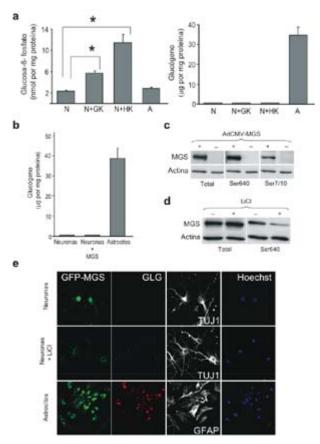


FIGURA 2. Efecto del incremento de los niveles intracelulares de G6P en neuronas. Inactivación de MGS por fosforilación. (a) Los gráficos muestran los niveles intracelulares de G6P (izquierda) y el contenido de glucógeno (derecha) de neuronas que sobreexpresan glucoquinasa (N + GK) o hexoquinasa I(N + HK) y neuronas sin infectar (N). Un incremento de 5 veces en los niveles intracelulares de G6P no incrementaba la acumulación de glucógeno. Los niveles de G6P representan la media \pm s.e.m. (n= 5-7) de tres experimentos independientes. *P<0,001 no infectada versus neuronas infectadas con AdCMV-GK o AdCMV-HKI. El contenido de glucógeno representa la media \pm s.e.m. (n= 6-10) de tres experimentos independientes. (b) Contenido de glucógeno en cultivos primarios de neuronas y astrocitos. El glucógeno era indetectable en las neuronas infectadas con AdCMV-MGS (N+MGS, MOI (multiplicidad de infección) 100). El contenido de glucógeno representa la media \pm s.e.m. (n= 6) de tres experimentos independientes. (c) Análisis por western blot de neuronas infectadas con AdCMV-MGS (+, MOI 100) o sin infectar (-). Para este análisis utilizamos anticuerpos que reconocían la MGS total, la MGS fosforilada en la Ser640 o la fosforilada en la Ser7/10. (d) Western blot de neuronas que sobreexpresaban MGS y que habían sido cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de LiCl 20 mM (24 h). (e) Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra glucógeno (GLG) y marcadores específicos de neuronas (TUJ1) y astrocitos (GFAP). Marcábamos los núcleos mediante Hoechst 33342. Las células fueron tratadas con AdCMV-GFP-MGS (MOI 50 para neuronas y MOI 5 para astrocitos). Las neuronas acumulaban glucógeno cuando las tratábamos con LiCl 20 mM durante 24 h.

partículas de glucógeno. De esta manera, PTG estimula la desfosforilación de GS y, en consecuencia, incrementa la acumulación de glucógeno (71).

Para estudiar los efectos de la PTG en neuronas, utilizamos adenovirus recombinantes que expresan esta proteína fusionada a GFP, lo que nos permitía estudiar su localización intracelular y controlar sus niveles de expresión. El incremento en los niveles intracelulares de PTG supuso un gran estímulo en la acumulación de glucógeno. El contenido de este polisacárido incrementaba de manera dramática en las células neuronales, que pasaban de no acumular glucógeno a contener elevadas cantidades (Figura 3). El glucógeno acumulado dependía de los niveles de PTG (Figura 3a) e incrementaba progresivamente con el tiempo (Figura 3b). Mediante inmunofluorescencia pudimos observar que el glucógeno sintetizado se distribuía por todo el soma celular pero también en neuritas y axones (Figura 3c).

La actividad de MGS incrementaba drásticamente con la PTG y se acercaba a valores próximos a la plena activación (Figura 3d), tal como observábamos al determinar la relación de actividades (–G6P/+G6P), que es una medida no lineal del estado de activación del enzima. La activación de MGS estimulada por PTG se correspondía con una desfosforilación de la enzima en Ser640 y Ser7/10 (Figura 3e), tal como observábamos por *western blot*. Además, la enzima mostraba una movilidad electroforética incrementada, característica del estado desfosforilado (73).

Es importante resaltar que los niveles endógenos de la proteína PTG en neuronas son bajos en comparación con otras células. Además, la relación de PTG/MGS es muy baja en comparación a lo que ocurre en músculo o astrocitos (Figura 3f), lo que podría sugerir que en neuronas es más difícil que la PP1 actúe sobre MGS.

Debido a que los cuerpos de Lafora están formados principalmente por polímeros de glucosa pobremente ramificados, analizamos el estado de ramificación del glucógeno acumulado por las neuronas. Para ello aplicamos el método de Schlamowitz (74), consistente en determinar el espectro de absorción del complejo del polisacárido con yodo. Para el glucógeno sintetizado en neuronas en respuesta a PTG el pico del complejo se daba a 511 nm, indicando que estaba pobremente ramificado.

Para determinar el papel de laforina y malina en la generación de los cuerpos de Lafora, analizamos su capacidad para modular la acumulación de glucógeno inducida por PTG. La estrategia consistía en sobreexpresar laforina o malina junto con PTG. Dado que queríamos sobreexpresar simultáneamente de manera

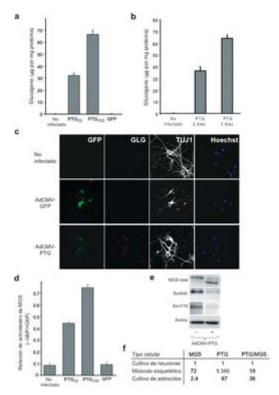


FIGURA 3. El incremento de los niveles de PTG en neuronas estimula la desfosforilación de MGS y activa la acumulación de glucógeno en estas células. (a) Contenido de glucógeno en neuronas tratadas con AdCMV-PTG a baja (PT G_{50}) y alta (PT G_{100}) MOI. La sobreexpresión de PTG tenía un marcado efecto en la estimulación de glucógeno en neuronas. El contenido de glucógeno representa la media \pm s.e.m. (n= 6-10) de tres experimentos independientes. (b) Contenido de glucógeno en neuronas tratadas con AdCMV-PTG a baja MOI (PTG₅₀) después de 2 y 3 días de expresión de la proteína recombinante. La acumulación de glucógeno incrementaba progresivamente con el tiempo después de la infección con el adenovirus. El contenido de glucógeno representa la media ± s.e.m. (n= 6-9) de tres experimentos independientes. (c) Inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo contra glucógeno (GLG), de cultivos primarios de neuronas tratados con AdCMV-PTG (MOI 50). Utilizamos TUJ1 y Hoechst 33342 como marcadores de neuronas y núcleos, respectivamente. Como control de la infección con adenovirus, las neuronas fueron tratadas con AdCMV-GFP (MOI 50). El glucógeno se acumula en el soma celular y en las neuritas. (d) Relación de actividades de MGS (-G6P/+G6P) en neuronas tratadas con AdCMV-PTG a baja (PTG₅₀) y alta (PTG₁₀₀) MOI. La sobreexpresión de PTG tenía un marcado efecto en la estimulación de la actividad de MGS. La relación de actividades de MGS representa la media \pm s.e.m., n=6-12, de tres experimentos independientes. (e) Western blot de neuronas tratadas (+) con AdCMV-PTG (MOI 100) o sin infectar (-). Utilizamos anticuerpos que reconocían la MGS total o la MGS fosforilada en la Ser640 o en la Ser7/10. La sobreexpresión de PTG estimulaba la desfosforilación de MGS en estos sitios. (f) Análisis mediante Real-Time PCR de la expresión de PTG y MGS. Los niveles de transcritos de MGS y PTG en músculo o astrocitos fueron comparados con los valores obtenidos en cultivos de primarios de neuronas, a los que les fue asignado un valor de 1. La relación entre los transcritos de PTG respecto a los de MGS (PTG/MGS) en neuronas era más baja que en músculo o astrocitos.

controlada varias proteínas y que el número de condiciones experimentales era elevado, trabajamos inicialmente en células Neuro2a diferenciadas (N2a), línea celular obtenida a partir de un neuroblastoma espontáneo de un ratón albino y que habíamos mostrado que, por lo que respecta al metabolismo del glucógeno, tenían un comportamiento similar a los cultivos primarios de neuronas (75). En las condiciones en que laforina o malina eran expresadas cada una por separado junto con PTG, no observábamos ningún efecto en la acumulación de glucógeno (Figura 4a). No obstante, al sobreexpresar laforina y malina simultáneamente junto a PTG los resultados obtenidos fueron espectaculares, ya que se bloqueaba completamente la síntesis del polisacárido (Figura 4a). Estos resultados demuestran que laforina y malina participan en el control del metabolismo del glucógeno.

Dado que malina tiene actividad E3 ubiquitina ligasa, pudiendo así estimular la degradación de proteínas vía proteasoma, decidimos estudiar si se producían variaciones en los niveles de las proteínas implicadas en la síntesis del glucógeno. Mediante western blot, observábamos que en condiciones de sobreexpresión conjunta de laforina y malina, se producía una reducción drástica en los niveles de MGS y PTG (Figura 4b), tanto en N2a como en neuronas. Además, los niveles de laforina también disminuían en presencia de malina (Figura 4b), aunque en menor medida. En cambio, los niveles intracelulares de malina aumentaban sustancialmente cuando ésta era coexpresada junto a laforina (Figura 4b), sugiriendo que laforina estabiliza los niveles de malina. Por lo tanto, los niveles de malina estaban inversamente correlacionados con los de MGS, PTG y laforina. La reducción en los niveles de MGS observada por western blot en las células que expresaban conjuntamente laforina y malina correlacionaba con una reducción de la actividad total de esta enzima, que llegaba a ser prácticamente indetectable (Figura 4c). Los efectos observados eran específicos, ya que los niveles de otras proteínas implicadas en el metabolismo del glucógeno, como hexoquinasa I o GSK3, no variaban (75). Para analizar la probable participación del sistema ubiquitina-proteasoma en este proceso, utilizamos dos inhibidores del proteasoma: MG-132 y lactacistina (76). Ambos bloqueaban la reducción de MGS, PTG y laforina inducida por la acción conjunta de laforina y malina (Figura 4d). Además, mediante Real-Time PCR, confirmamos que los niveles de transcripción de MGS, PTG y laforina no estaban afectados, indicando que los cambios observados no eran causados por alteraciones en los niveles de transcripción (75). Hay que hacer notar que la cantidad de malina expresada en ausencia de laforina era más elevada cuando las células eran incubadas con los inhibidores de proteasoma (Figura 4d). Esta observación sugiere que malina también es degradada por el sistema ubiquitina-proteasoma. En cultivos primarios de neuronas obtuvimos resultados similares (75).

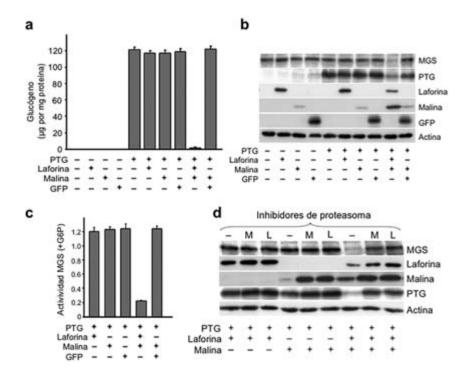


FIGURA 4. Bloqueo de la síntesis de glucógeno por laforina y malina. (a) Contenido de glucógeno en células N2a (media \pm s.e.m., n= 14-23, de seis experimentos independientes) incubadas con los adenovirus indicados en la figura, utilizados a una MOI de 20, con la excepción del AdCMV-PTG, el cual fue utilizado a una MOI de 5. La coexpresión de laforina y malina bloqueaba la acumulación de glucógeno inducida por PTG. (b) Análisis por western blot de células N2a tratadas con adenovirus recombinantes en las mismas condiciones que se han descrito en a. MGS, PTG y laforina experimentaban una marcada reducción cuando coexpresábamos laforina y malina. (c) Medida de la actividad total de MGS (+G6P) de células N2a (media ± s.e.m., n= 6-8, de tres experimentos independientes) después de su infección con AdCMV-PTG, AdCMV-laf, AdCMV-malina y AdCMV-GFP en las mismas condiciones que se han descrito en a. La coexpresión de laforina y malina reducía la actividad total de MGS. (d) Western blot de células N2a incubadas con los adenovirus recombinantes indicados en la figura y tratadas durante 18 h con los inhibidores del proteasoma MG-132 (M) a una concentración de 1 µM o lactacistina (L) a 5 μM. Los inhibidores de proteasoma fueron añadidos 4 h después de la incubación con los adenovirus. Las células fueron procesadas para western blot 22 h después de la infección. Todos los virus fueron utilizados a una MOI de 10, excepto el AdCMV-PTG que fue utilizado a una MOI de 2. El tratamiento con los inhibidores de proteasoma bloqueaba la degradación de MGS, PTG y laforina observada en células que coexpresaban laforina y malina. Además, incrementaba los niveles de malina bloqueando la marcada degradación de esta proteína que se producía cuando no era coexpresada conjuntamente con laforina.

Los dominios NHL de malina le permiten interactuar con laforina (62). En algunos enfermos de Lafora, se ha identificado la mutación D146N que, sin alterar su actividad enzimática, afecta a su capacidad para interaccionar con laforina (62, 77). Al sustituir la malina de tipo salvaje por el mutante D146N no se producía el bloqueo de la acumulación de glucógeno (Figura 5a) y, en contraste a la malina de tipo salvaje, el mutante no inducía la degradación de PTG, MGS o laforina (Figura 5b). Además, los niveles del mutante D146N no podían ser estabilizados por laforina tal como ocurre con la malina de tipo salvaje (Figura 5b). El conjunto de estos resultados nos mostraba que la interacción entre laforina y malina es crucial para su acción.

Si el complejo laforina -malina es capaz de reducir los niveles de MGS y PTG, la ausencia de cualquiera de los dos componentes del complejo debería resultar en unos niveles de MGS y PTG incrementados. Así, conseguimos el silenciamiento de laforina en N2a usando oligonucléotidos de ARN de interferencia (siRNA) (Figura 5c). En esas células knockdown de laforina observábamos un marcado incremento de los niveles de MGS y PTG en comparación con aquellas células transfectadas con los siRNA control (Figura 5d, e). Además, estas células acumulaban más glucógeno bajo condiciones glucogénicas (Figura 5f).

Estos resultados desvelan un nuevo mecanismo de regulación de la síntesis de glucógeno en el que juegan un importante papel las dos proteínas cuyas mutaciones causan la enfermedad de Lafora y ofrece una explicación a la formación de los característicos cuerpos de Lafora. Estos datos, en conjunto, establecen la implicación del sistema laforina-malina en el control de la estabilidad de MGS y PTG y, por consiguiente, en la síntesis de glucógeno. Sin embargo, estos resultados hacen aún más intrigante el hecho de que las neuronas no acumulen glucógeno en condiciones normales. La pregunta que surge a partir de esta información es porqué las neuronas han conservado la capacidad de sintetizar glucógeno, aunque mantienen la maquinaria inactivada con la participación de un complicado proceso de degradación de proteínas que probablemente les supone consumir energía.

Existen varios ejemplos en que la acumulación de inclusiones intracelulares en neuronas tiene efectos devastadores para estas células. Tal es el caso del Alzheimer o la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. Por lo tanto, era interesante estudiar si las neuronas evitan a toda costa formar glucógeno por resultarles perjudicial la acumulación de polímeros de glucosa.

La apoptosis es un proceso de suicidio celular y es uno de los principales tipos de muerte celular programada. Se trata de un conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en una célula de un organismo pluricelular, encami-

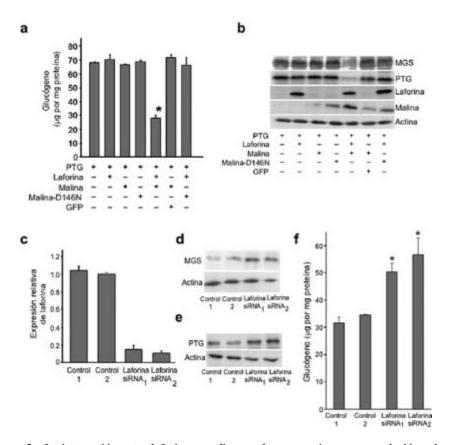


FIGURA 5. La interacción entre laforina y malina es clave para ejercer su regulación sobre el metabolismo del glucógeno. (a) Contenido de glucógeno en células N2a (media ± s.e.m., n= 6-8, de tres experimentos independientes) incubadas con los adenovirus recombinantes indicados en la figura, utilizados a una MOI de 5, con la excepción del AdCMV-PTG, el cual fue utilizado a una MOI de 3. El mutante D146N de malina no era efectivo en la inhibición de la acumulación de glucógeno. *p<10⁻⁵ versus infecciones únicas, dobles y las infecciones triples con AdCMV-PTG + AdCMV-malina + AdCMV-GFP y AdCMV-PTG + AdCMV-laforina + AdCMV-malinaD146N. (b) Análisis por western blot de células N2a tratadas con adenovirus en las mismas condiciones que se han descrito en **a.** El mutante de malina (D146N) no reducía los niveles de MGS y PTG. Los niveles de malina fueron estabilizados en presencia de laforina (compárese las líneas 3 ó 6 con la línea 5). En contraste, el mutante de malina- D146N no era estabilizado por laforina (compárese las líneas 4 y 7). (c) Cuantificación de la expresión de laforina por Real-Time PCR. Los niveles de los transcritos de laforina se muestran como valores relativos respecto a las N2a que fueron tratadas con siRNA control (Control 1, GAPDH; Control 2, scrambled siRNA). Los niveles de transcritos de mRNA representan la media \pm s.e.m., n=3-5, de tres experimentos independientes. (d) Análisis por western blot de los niveles de MGS en células N2a knockdown de laforina. (e) Análisis por western blot de los niveles de PTG en células N2a knockdown de laforina infectadas con AdCMV-PTG (MOI 2). (f) Contenido de glucógeno (media ± s.e.m. de tres experimentos independientes) en células N2a knockdown de laforina infectadas con AdCMV-PTG (MOI 2). *p<0,05 versus células Control 1 y Control 2.

nadas, a diferencia de la necrosis, a producir la muerte de manera controlada. La membrana celular no se destruye durante el proceso de apoptosis, impidiendo de esta manera que se libere su contenido intracelular al espacio extracelular. Durante la apoptosis se producen dos eventos claves, la activación de enzimas proteolíticas (caspasas) y la condensación y fragmentación de la cromatina. Por este motivo, utilizamos dos pruebas que nos permitieran valorar si la acumulación de glucógeno generaba apoptosis: la técnica de TUNEL, que permite teñir los residuos de uridina de los fragmentos nucleares de DNA característicos de la apoptosis, y la activación de caspasa-3, una de las principales proteasas involucradas en el proceso de apoptosis. Sorprendentemente, si manteníamos a las neuronas acumulando glucógeno durante períodos prolongados, se producía un gran incremento en el porcentaje de células apoptóticas, tal como observábamos con la técnica TUNEL (Figura 6a) y en el porcentaje de neuronas que eran positivas para la caspasa-3 activada (Figura 6b). La activación de la apoptosis dependía del tiempo que transcurría desde el inicio de la acumulación de glucógeno (Figura 6b).

El siguiente paso fue estudiar que ocurría en los astrocitos, que normalmente acumulan glucógeno, cuando los forzábamos a acumular más cantidad de este polisacárido por sobreexpresión de PTG. En estas células no se producía activación de caspasa-3 (Figura 6c, d) a pesar de que acumulaban 20 veces más glucógeno que las neuronas en las mismas condiciones (Figura 6e) y, además, sobreexpresaban niveles de PTG más elevados (Figura 6c).

En base a estos resultados, parece lógico concluir que las neuronas eviten acumular glucógeno a toda costa ya que el polisacárido desencadena, en estas células, mecanismos de muerte. La inducción de la apoptosis por la acumulación de glucógeno abre un nuevo campo de investigación ya que, hasta la fecha, era un proceso desconocido cuyo estudio nos puede deparar interesantes resultados. En cambio, los astrocitos, células que normalmente acumulan glucógeno en gran parte para satisfacer las demandas energéticas de las neuronas, no mueren cuando son forzados a acumular más cantidad de glucógeno.

Nuestros resultados muestran que las neuronas tienen la capacidad de sintetizar glucógeno pero, en cambio, al no poseer GP, no pueden degradarlo. No obstante, a pesar de expresar MGS, las neuronas normalmente no almacenan este polisacárido ya que se ponen en funcionamiento toda una serie de mecanismos con el objetivo de silenciar la actividad de MGS y, de esta manera, evitar la síntesis de glucógeno. Un gran número de datos apoyan esta conclusión. De entrada, la relación de actividades (–G6P/+G6P) de la MGS es muy baja en neuronas y la enzima está fosforilada en los sitios más importantes que regulan

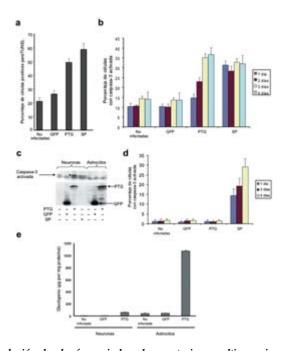


FIGURA 6. La acumulación de glucógeno induce la apoptosis en cultivos primarios de neuronas. (a) El porcentaje de células TUNEL-positivas (media ± s.e.m.) fue estimado en 8-14 campos (550-600 células en total) por cubre, tres cubres por cada condición experimental correspondientes a tres experimentos diferentes. La acumulación de glucógeno fue inducida por expresión de PTG durante 4 días (AdCMV-PTG, MOI 50). En la figura, GFP indica las células incubadas con AdCMV-GFP (MOI 50). Como control positivo de apoptosis tratábamos las neuronas durante 24 h con estaurosporina a una concentración de 0,1 µM (SP). El glucógeno incrementa el número de neuronas TUNEL-positivas. (b) Porcentaje de neuronas con caspasa-3 calculado mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra caspasa-3 activada y Hoechst 33342 como marcador de núcleos. Las células fueron tratadas en las mismas condiciones que se han indicado en a. La acumulación de glucógeno fue inducida por expresión de PTG durante 1, 2, 3 y 4 días (AdCMV-PTG, MOI 50). El porcentaje de células que presentan activación de la caspasa-3 representa la media ± s.e.m. de 8-14 campos (550-600 células en total) por cada cubre, tres cubres por tratamiento correspondientes a tres experimentos diferentes (c) Análisis mediante western blot de la activación de caspasa-3 en cultivos primarios de neuronas y astrocitos. La acumulación de glucógeno fue estimulada mediante la expresión de PTG durante 96 h (AdCMV-PTG, MOI 50 en neuronas, MOI 10 en astrocitos). Como control de infección utilizamos el AdCMV-GFP (MOI 50 en neuronas, MOI 10 en astrocitos). El asterisco indica la señal correspondiente a la caspasa-3 activada. El panel inferior muestra un western blot utilizando el anticuerpo contra GFP. (d) Porcentaje de astrocitos con caspasa-3 activada (media ± s.e.m., 9-14 campos (550-600 células en total) por cada cubre, tres cubres por tratamiento correspondientes a tres experimentos diferentes). La acumulación de glucógeno fue inducida por expresión de PTG durante 1, 3 y 4 días (AdCMV-PTG, MOI 10). En la figura, GFP indica las células incubadas con AdCMV-GFP (MOI 10). Como control positivo de apoptosis tratábamos los astrocitos durante 24 h con estaurosporina a una concentración de 0,1 μM (SP). (e) Diferencias entre los niveles intracelulares de glucógeno en neuronas y astrocitos. Contenido de glucógeno en células tratadas con AdCMV-PTG durante 72 h (AdCMV-PTG, MOI 50 en neuronas, MOI 10 en astrocitos). El contenido de glucógeno representa la media \pm s.e.m. (n= 4-6) de tres experimentos independientes. PTG induce una mayor acumulación de glucógeno en astrocitos que en neuronas.

su activación, lo que indica que se encuentra altamente inactivada. Además, toda una serie de estímulos que normalmente logran activar la síntesis de glucógeno resultan infructuosos en neuronas. En la mayoría de tipos celulares un aumento de los niveles de G6P conlleva una activación de GS y un incremento en el contenido de glucógeno (64, 65). Sin embargo, este no es el caso de las neuronas, lo que indica que la concentración de G6P no es una señal para desencadenar la síntesis de glucógeno en estas células. Esta «insensibilidad» de MGS a la activación por G6P podría ser una consecuencia de su estado hiperfosforilado, que reduce la afinidad de MGS por G6P (66, 78, 79). La «insensibilidad» a G6P podría tener una explicación fisiológica ya que en condiciones de elevada actividad neuronal y, por lo tanto, de elevada demanda energética, los niveles de G6P podrían incrementar debido a una mayor entrada de glucosa. Esta G6P debe de ser dirigida a la vía de la glucólisis para satisfacer las demandas energéticas y asegurar el correcto funcionamiento del sistema nervioso, por lo que las neuronas se muestran prevenidas para evitar la acumulación de glucógeno inducida por G6P ya que necesitan este metabolito para obtener energía. Además, los efectos pro-apotóticos de la acumulación de glucógeno en neuronas podrían ser también una buena razón para bloquear la estimulación de MGS por G6P, cuyo incremento se puede producir en situaciones fisiológicas.

Otro evidencia de la gran capacidad que tienen las neuronas para inactivar MGS es el hecho de que pueden llegar a silenciar niveles muy incrementados de esta enzima. La sobreexpresión de MGS en neuronas no conduce a la acumulación de glucógeno ya que la enzima es fosforilada en los sitios más importantes implicados en su regulación. No obstante, estas células sintetizan glucógeno si bloqueamos mediante litio la acción inactivadora de GSK3 sobre la MGS. Por lo tanto, las neuronas pueden sintetizar glucógeno si se consigue disminuir la fosforilación de MGS. La prueba más evidente de esta capacidad la obtuvimos al incrementar los niveles intracelulares de PTG. La sobreexpresión de esta proteína conduce a la síntesis masiva de glucógeno como consecuencia de la activación prácticamente total de la MGS por desfosforilación. Por lo tanto, la PTG podría jugar un fundamental en el metabolismo del glucógeno neuronal. Sin embargo, los niveles endógenos de PTG en neuronas son bajos en comparación con otras células que normalmente sintetizan glucógeno. Además, el hecho de que la relación entre los transcritos de PTG respecto a los de MGS sea tan baja en comparación con el músculo o los astrocitos, indica que la activación de la MGS por PTG no está favorecida en neuronas. Estos datos sugieren que la facilidad de las neuronas para inactivar a la MGS por fosforilación, unida a su poca capacidad para revertir este proceso, puede ser fundamental para mantener la síntesis de glucógeno a cero. A este bien coordinado proceso

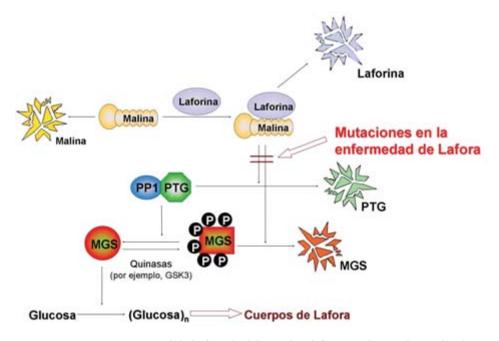


Figura 7. Esquema general de la función del complejo laforina-malina en la regulación del metabolismo del glucógeno en neuronas.

de regulación de la síntesis de glucógeno se suma la acción de las dos proteínas cuya alteración da lugar a la enfermedad de Lafora, es decir, laforina y malina. Estas proteínas, a través de la formación de un complejo entre ambas, son capaces de regular los niveles intracelulares de MGS y PTG mediante el sistema ubiquitina-proteasoma (Figura 7) ejerciendo así un papel clave en la regulación de la síntesis de glucógeno. De hecho, se trata de un mecanismo muy potente de regulación ya que es capaz de inducir la degradación de las dos proteínas claves para sintetizar glucógeno, es decir, la enzima capaz de formar polímeros de glucosa y la proteína que permite su activación. Por lo tanto, los datos mostrados proporcionan un enlace molecular entre el fallo en la función de laforina o malina y la acumulación anómala de glucógeno en neuronas en pacientes con enfermedad de Lafora.

Este mecanismo era completamente desconocido hasta ahora y puede ser fundamental no tan solo para entender la enfermedad de Lafora y otras enfermedades que cursen con acumulación de poliglucosanos en neuronas, sino que establecen el papel de estos dos nuevos jugadores en el metabolismo del glucógeno. La acción del complejo laforina-malina se suma a los bien conocidos

de activación alostérica y regulación por fosforilación/desfosforilación, con el que está estrechamente relacionado ya que también regula los niveles intracelulares de PTG. Así, el complejo laforina-malina ejerce un control adicional superpuesto a los mecanismos de regulación previamente conocidos y añade un nuevo nivel de complejidad al control global de la síntesis de glucógeno. Aunque pudiera ser predominante en neuronas, este mecanismo está probablemente implicado en la regulación de la síntesis de glucógeno de manera más general, ya que la expresión de laforina y malina no está restringida a neuronas. Probablemente, funcione para prevenir el exceso de síntesis de glucógeno en ciertos tejidos o detener su síntesis bajo condiciones fisiológicas específicas.

Una de las características más intrigantes del sistema es que malina, además de interaccionar con laforina, promueve su degradación. Y es intrigante porque parece estar en conflicto con una de las características de la enfermedad, es decir, el hecho de que mutaciones recesivas tanto en una proteína como en la otra dan lugar a la patología. Nosotros proponemos que la degradación de laforina podría ser un interruptor de seguridad. Es decir, cuando los niveles de laforina son bajos no se forma el complejo laforina-malina y entonces la degradación de MGS y PTG se detiene. Cuando malina está unida a laforina, se activa la degradación de ésta última junto con la de MGS y PTG. Así llega un momento en que los niveles de laforina son insuficientes con lo que se detiene la degradación de MGS y PTG. Por lo tanto, la degradación de laforina permitiría a malina autorregularse. Además, los niveles de malina también se ven reducidos en ausencia de laforina, a través del sistema ubiquitina-proteasoma. Este hecho nos sugiere que cuando los niveles de laforina son reducidos la malina se degrada; lo que contribuiría a detener su acción sobre sus proteínas diana. Esta doble regulación debería asegurar que MGS y PTG no se degradan más allá de lo necesario. Siguiendo esta línea, la autorregulación del sistema no acaba aquí porque también funciona en sentido inverso. A medida que los niveles de malina van reduciéndose, llegará el momento en que los niveles de laforina vuelvan a aumentar al no ser degradada. De esta manera, laforina vuelve a interaccionar con malina y, de nuevo, se estabilizan los niveles de la ubiquitina ligasa. El control de la degradación de ambas proteínas podría ser muy importante en células que normalmente sintetizan glucógeno.

Nuestros resultados muestran además que la acumulación de glucógeno deriva en problemas para las neuronas. Un fallo en el mecanismo que mantiene a MGS bajo control puede tener efectos letales para estas células debido a que almacenar glucógeno conlleva su entrada en apoptosis. Sin duda, este es uno de los resultados más sorprendentes de nuestro trabajo y puede dar un nuevo enfoque al estudio del metabolismo del glucógeno en cerebro. Los efectos apop-

tóticos del glucógeno parecen ser específicos de neuronas ya que, por ejemplo, no tiene este efecto en astrocitos, células que normalmente acumulan este polisacárido. El hecho de que el glucógeno induzca la apoptosis en neuronas nos permite responder a la pregunta de porqué las neuronas, a pesar de tener la maquinaria, ponen en funcionamiento toda esta serie de sistemas bien coordinados con el objetivo de evitar la síntesis de glucógeno. Por lo tanto, parece que estas células tienen una relación ambivalente con el glucógeno ya que, por un lado, se benefician de su acumulación en los astrocitos mientras que, por el otro, si lo almacenan en su interior se activa la apoptosis. En relación a los beneficios que tiene para las neuronas la acumulación de glucógeno en astrocitos, se ha descrito que el incremento de este polisacárido en la glía tiene un efecto neuroprotector (2, 80). Una de las definiciones que resume a la perfección el proceso es que el glucógeno actúa como un caballo de Troya en neuronas (81). Es probable que estos efectos sean el motivo por el cual estas células mantengan activos una serie de procesos bien coordinados que impidan la acumulación de glucógeno a pesar de ser muy complejos y de que probablemente consuman energía (interacciones proteína-proteína, degradación de proteínas,...).

Hay que hacer notar que la activación de MGS en neuronas da lugar a un glucógeno pobremente ramificado que además tendrá problemas para ser degradado ya que no encontramos cantidades detectables de GP. Todos estos factores reflejan la necesidad de mantener bajo control la síntesis de glucógeno y, probablemente, el complejo laforina-malina tenga un papel importante para prevenir la acumulación de una molécula potencialmente peligrosa para las neuronas. La alteración de este sistema explicaría la acumulación en la enfermedad de cuerpos de inclusión de composición similar al glucógeno. De momento, desconocemos el alcance que tiene este fenómeno en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Lafora. Aunque nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que en esta enfermedad el glucógeno da lugar a alteraciones en la función neuronal, no podemos excluir la posibilidad de que existan otras dianas potenciales del complejo laforina-malina que también estén implicadas en la patogénesis de la enfermedad de Lafora.

Aunque hemos ofrecido nuevas respuestas y aclaraciones a la enfermedad de Lafora y a la regulación del glucógeno en cerebro, este trabajo plantea algunas cuestiones sobre las que podría ser muy interesante profundizar en un futuro. Por ejemplo, ¿a través de qué mecanismos la acumulación de glucógeno desencadena la apoptosis en neuronas? ¿Por qué los astrocitos y otras células son inmunes a los efectos proapotóticos de la acumulación de glucógeno? ¿Existen otras células sensibles de esta manera a la acumulación de glucógeno? Además, todavía queda por elucidar el enlace real entre la acumulación de glucógeno y el fenoti-

po clínico de la enfermedad de Lafora ¿por qué los síntomas empiezan a partir de una determinada edad? Por ejemplo, los niveles de expresión de PTG también podrían variar en función del estado hormonal. De hecho, ya se han descrito cambios de su expresión en cerebro en función de varias hormonas y neuromoduladores (72), por lo que podrían tener lugar determinadas situaciones en las que el complejo laforina-malina deba funcionar al máximo para controlar a PTG. Quizás, exista un estímulo que desencadene la activación de MGS en neuronas en una determinada edad y que necesite al complejo laforina-malina a pleno rendimiento. O quizás el hecho de que laforina o malina fallen desde el inicio provoque que se vaya acumulando glucógeno poco a poco hasta llegar a un punto en el que sea neurotóxico. Otras aspectos que permanecen desconocidos son, por ejemplo, el sustrato de la actividad fosfatasa de laforina, la importancia y la función de su actividad como fosfatasa de carbohidratos, la búsqueda de otras posibles dianas del complejo laforina-malina y la profundización en la regulación de este complejo. Otro de los misterios de la enfermedad de Lafora es la identidad del tercer gen implicado que se postula está afectado en aproximadamente un 10% de los pacientes...; Tendrá un papel en el metabolismo del glucógeno?

Sin duda, una de las preguntas más interesantes es por qué las neuronas están dotadas con el potencial para sintetizar glucógeno, si deben activar sistemas complejos para mantenerlo inactivo. Una posibilidad es que la estructura genómica del gen que codifica para la MGS (gys1) no permita el silenciamiento de la expresión de esta enzima sin interferir con la expresión de otros genes relevantes para la correcta función neuronal o que, simplemente, debido a su importancia para el funcionamiento del organismo este gen esté programado inicialmente para expresarse de manera ubicua. Aunque la hipótesis más interesante es que MGS pueda tener un papel independiente de la capacidad de sintetizar glucógeno y que pueda tener una función importante en neuronas. El hecho de que se acumule en el núcleo podría ser relevante para esta hipotética función alternativa.

La enfermedad de Lafora podría ser considerada el paradigma de las enfermedades neurológicas que acumulan glucógeno por la edad en que se manifiestan sus síntomas, su rápida progresión y sus dramáticas consecuencias. Sin embargo, la acumulación de polímeros de glucosa también tiene lugar en otras enfermedades neurológicas o neurodegenerativas y en aquellas asociadas con el envejecimiento. Una vez demostrados los efectos deletéreos de la acumulación de glucógeno en neuronas, no podemos dejar de formular la teoría de que la acumulación de glucógeno aberrante pueda estar implicada en la neurodegeneración o contribuir a los síntomas de algunas de estas enfermedades.

Es decir, que los efectos neurotóxicos del glucógeno sean un fenómeno más generalizado y no específico de la enfermedad de Lafora. Nosotros planteamos que esta enfermedad sea uno de los casos más extremos donde la acumulación de glucógeno tiene unos efectos más claros y graves. En este caso, al fallar directamente los «guardianes» del metabolismo del glucógeno se dispara su acumulación y los efectos neurotóxicos se observan rápidamente y de manera drástica. Quizás, en otras enfermedades, los cambios sobre el metabolismo del glucógeno son más sutiles y el polisacárido se acumula de forma ralentizada respecto a la enfermedad de Lafora. La posibilidad de que la acumulación de glucógeno esté implicada en varias enfermedades neurodegenerativas podría abrir un nuevo campo de investigación hacia la búsqueda de estrategias terapéuticas preventivas que permitan controlar el metabolismo del glucógeno. Tal vez, estos resultados sean la punta de lanza que le den una nueva dimensión al estudio de la formación de depósitos de polímeros de glucosa en neuronas y sirvan para dar relevancia a este proceso. La lista de enfermedades neurológicas que cursan con acumulación de glucógeno es extensa. En algunas de ellas, los efectos pueden parecer más obvios mientras que en otros probablemente representen un papel menor ya que la deposición de otras moléculas parece tener mucha más importancia relativa. Existe una amplia variación en el número de PGBs hallados que depende de la edad y de la enfermedad neurológica. Entre estas enfermedades, podemos encontrar las clásicas donde la acumulación de glucógeno anómalo se ha descrito como una característica inseparable: La enfermedad de Bielschowsky, la enfermedad de los cuerpos de poliglucosano del adulto y la enfermedad de Anderson. No hay que dejar de lado los cuerpos amiláceos, cuyo estudio se ha descuidado durante mucho tiempo debido a su aparente irrelevancia en enfermedades neurológicas. Estos depósitos están formados principalmente por polisacáridos, y presentan una composición muy similar a los cuerpos de Lafora con una estructura más similar al almidón que al glucógeno. La cantidad y dimensiones de estos cuerpos de inclusión son extraordinariamente bajas en jóvenes. Sin embargo, a partir de los 30-40 años se vuelven mucho más grandes y su número incrementa drásticamente. Su tamaño y número crecen de manera constante después de los 50 años, siendo mucho más numerosos en casos como el Parkinson. Por este motivo se asocian al envejecimiento y existe una opinión general basada en evidencias anecdóticas de que enfermedades neurológicas crónicas están asociadas con un incremento en su número, como el Alzheimer y la esclerosis múltiple (82). Por ejemplo, en la corteza cerebral de enfermos de Alzheimer se ha descrito la acumulación de PGBs (83). También se ha visto en estudios post-mortem que su cantidad incrementa en enfermos con encefalopatías vasculares (84). Existen trabajos que sugieren que los cuerpos amiláceos podrían ser un indicador de neurodegeneración (85). En otras situaciones patológicas, también se ha encontrado una acumulación masiva de estos cuerpos amiláceos, como en epilepsias del lóbulo temporal (86-88). La cuantificación del contenido de glucógeno en cerebro de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, muestra un incremento de su contenido en cerebro (89). Otras situaciones patológicas muestran también una deposición de glucógeno en determinadas neuronas. Por ejemplo, la administración de drogas psicotrópicas (como la clorpromazina), la isquemia y la hipoxia. También se han observado acumulaciones de glucógeno en las neuronas adyacentes a tumores cerebrales. Además, se han observado depósitos de glucógeno en neuronas de pacientes diabéticos que muestran neuropatía y en ratas diabéticas crónicas.

Esperamos que este trabajo dé lugar a un renovado interés sobre el metabolismo del glucógeno en cerebro, un campo que se ha desarrollado de manera discreta aunque constante durante los últimos 25 años. Además, confiamos que contribuya a encontrar nuevas terapias que ayuden a combatir la enfermedad de Lafora, que resulta tan terrible tanto para los pacientes como para los familiares. Quizás, los efectos neurotóxicos del glucógeno puedan ser extrapolados a otras enfermedades con lo que se podrían desarrollar nuevas terapias que tengan en cuenta la acumulación de este polisacárido como un factor clave.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Susana Ros, Daniel Cifuentes, Lluís Pujadas, Jordi Vallès, Belén García-Fojeda, Olga Criado-García, Elena Fernández-Sánchez, Iria Medraño-Fernández, Jorge Domínguez, Mar García-Rocha y Eduardo Soriano su contribución a este trabajo. Agradecemos a Emma Veza y Anna Adrover su ayuda técnica y a José María Serratosa y Pascual Sanz su asesoramiento. Este estudio fue financiado mediante subvenciones de *Fundació La Caixa*, *Fundació la Marató de TV3*, Fundación Marcelino Botín, por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-00913; BFU2005-02253), por el Instituto de Salud Carlos III (CIBER-ER y CIBERDEM) y por la *Generalitat de Catalunya* (2005-SGR-00570).

BIBLIOGRAFÍA

(1) Nelson, S.R. et al. (1968) Control of glycogen levels in brain. *J. Neurochem.* 15: 1271-9.

- (2) Brown, A.M. (2004) Brain glycogen re-awakened. J. Neurochem. 89: 537-52.
- (3) Brown, A.M. AND RANSOM, B.R. (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55: 1263-71.
- (4) CATALDO, A.M. AND BROADWELL, R.D. (1986) Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. J. Neurocytol. 15: 511-24.
- (5) Frier, B.M. and Fisher, B.M. (1999) Hypoglycaemia in Clinical Diabetes. New York: John Wiley and Sons, Ltd.
- (6) Garrett, R.H. and Grisham, C.M. (1999) *Biochemistry*. Fort Worth: Saunder College Publishing.
- (7) STRYER, L. (1995) Biochemistry. New York: W.H. Freeman & Co.
- (8) Brown, A.M.; Tekkok, S.B. and Ransom, B.R. (2003) Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J. Physiol.* 549: 501-12.
- (9) Choi, I.Y.; Seaquist, E.R. and Gruetter, R. (2003) Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism *in vivo. J. Neurosci. Res.* 72: 25-32.
- (10) Kong, J. Et al. (2002) Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. *J. Neurosci.* 22: 5581-7.
- (11) PALLADIN, A.V. (1965) Biochemistry of the Nervous System. Washington DC: Herschkopf S, ed.
- (12) Folbergrova, J.; Lowry, O.H. and Passonneau, J.V. (1970) Changes in metabolites of the energy reserves in individual layers of mouse cerebral cortex and subjacent white matter during ischaemia and anaesthesia. *J. Neurochem.* 17: 1155-62.
- (13) ROSENGARTEN, H. (1970) Glycogen level and oxygen consumption of rabbit brain tissue slices under ethyl ether and halothane anesthesia. *Agressologie*. 11: 159-62.
- (14) CRUZ, N.F. AND DIENEL, G.A. (2002) High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 22: 1476-89.
- (15) SWANSON, R.A. ET AL. (1992) Sensory stimulation induces local cerebral glycogenolysis: demonstration by autoradiography. *Neuroscience*. 51: 451-61.
- (16) Magistretti, P.J. (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J. Exp. Biol.* 209: 2304-11.
- (17) Magistretti, P.J.; Sorg, O. and M. J.L. (1993) Regulation of glycogen metabolsim in astrocytes: physiological, pharmacological, and pathological aspects., in Astrocytes: Pharmacology and Function, S. Murphy, ed., Editor. Academic Press, Inc.: San Diego. p.: 243-265.

- (18) Dringen, R.; Gebhardt, R. and Hamprecht, B. (1993) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.* 623: 208-14.
- (19) POITRY-YAMATE, C.L.; POITRY, S. AND TSACOPOULOS, M. (1995) Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J. Neurosci.* 15: 5179-91.
- (20) SCHURR, A.; West, C.A. AND RIGOR, B.M. (1988) Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science*. 240: 1326-8.
- (21) Wender, R. et al. (2000) Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J. Neurosci.* 20: 6804-10.
- (22) Brown, A.M. Et al. (2005) Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J. Neurosci. Res.* 79: 74-80.
- (23) LAFORA, G.R. (1911) Über das Corkommen amyloider Körperchen im Innern der Ganglienzellen; zugliech Ein zum Studium der amyloiden Substanz im Nervensystem. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 205: 294-303.
- (24) LAFORA, G.R. AND GLUECK, B. (1911) Beitrag zur Histogpathologie der myoklonischen Epilepsie. Z. Gesamte Neurol. Psychiatr. 6: 1-14.
- (25) Nanduri, A.S. et al. (2008) The maestro don Gonzalo Rodriguez-Lafora. *Epilepsia*.
- (26) SAKAI, M. ET AL. (1970) Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). II. Polyglucosans in the systemic deposits of myoclonus epilepsy and in corpora amylacea. *Neurology*. 20: 160-76.
- (27) Yokoi, S.; Austin, J. and Witmer, F. (1967) Isolation and characterization of Lafora bodies in two cases of myoclonus epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 26: 125-7.
- (28) Yokoi, S. et al. (1968) Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). I. Isolation and preliminary characterization of Lafora bodies in two cases. *Arch. Neurol.* 19: 15-33.
- (29) Yokoi, S.; Nakayama, H. and Negishi, T. (1975) Biochemical studies on tissues from a patient with Lafora disease. *Clin. Chim. Acta*. 62: 415-23.
- (30) Berkovic, S.F. et al. (1993) Progressive myoclonus epilepsies: clinical and genetic aspects. *Epilepsia*. 34: S19-30.
- (31) BUSARD, B.L. ET AL. (1986) Lafora's disease. Comparison of inclusion bodies in skin and in brain. *Arch. Neurol.* 43: 296-9.

- (32) Busard, H.L. et al. (1987) Axilla skin biopsy: a reliable test for the diagnosis of Lafora's disease. *Ann. Neurol.* 21: 599-601.
- (33) CAVANAGH, J.B. (1999) Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 29: 265-95.
- (34) Harriman, D.G.; Millar, J.H. and Stevenson, A.C. (1955) Progressive familial myoclonic epilepsy in three families: its clinical features and pathological basis. *Brain*. 78: 325-49.
- (35) Minassian, B.A. et al. (2000) Mutation spectrum and predicted function of laforin in Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Neurology*. 55: 341-6.
- (36) NISHIMURA, R.N. ET AL. (1980) Lafora disease: diagnosis by liver biopsy. Ann. Neurol. 8: 409-15.
- (37) ROGER, J. ET AL. (1992) Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence. Ed. J. Roger, et al. London: Libbey.
- (38) ROGER, J. ET AL. (1983) Early diagnosis of Lafora disease. Significance of paroxysmal visual manifestations and contribution of skin biopsy. *Rev. Neurol. (Paris)*. 139: 115-24.
- (39) Van Heycop Ten Ham, M.W. (1974) The Epilepsies. Handbook of Clinical Neurology, ed. P.J. Vinken and G.W. Bruyn. Vol. 15. Amsterdam: North Holland Publishing Group Company.
- (40) Minassian, B.A. (2001) Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis. *Pediatr. Neurol.* 25: 21-9.
- (41) CARPENTER, S. ET AL. (1974) Lafora's disease: peroxisomal storage in skeletal muscle. *Neurology*. 24: 531-8.
- (42) Schwarz, G.A. and Yanoff, M. (1965) Lafora's Disease. Distinct Clinico-Pathologic Form of University's Syndrome. *Arch. Neurol.* 12: 172-88.
- (43) Ganesh, S. et al. (2002) Genotype-phenotype correlations for EPM2A mutations in Lafora's progressive myoclonus epilepsy: exon 1 mutations associate with an early-onset cognitive deficit subphenotype. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1263-71.
- (44) Ganesh, S. et al. (2006) Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *J. Hum. Genet.* 51: 1-8.
- (45) Gomez-Abad, C. et al. (2005) Lafora disease due to EPM2B mutations: a clinical and genetic study. *Neurology*. 64: 982-6.
- (46) Minassian, B.A. et al. (1999) Genetic locus heterogeneity in Lafora's progressive myoclonus epilepsy. *Ann. Neurol.* 45: 262-5.
- (47) Chan, E.M. et al. (2004) Progressive myoclonus epilepsy with polyglucosans (Lafora disease): evidence for a third locus. *Neurology*. 63: 565-7.

- (48) Minassian, B.A., et al. (1998) Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* 20: 171-4.
- (49) Serratosa, J.M., et al. (1999) A novel protein tyrosine phosphatase gene is mutated in progressive myoclonus epilepsy of the Lafora type (EPM2). *Hum. Mol. Genet.* 8: 345-52.
- (50) Ganesh, S., et al. (2000) Laforin, defective in the progressive myoclonus epilepsy of Lafora type, is a dual-specificity phosphatase associated with polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2251-61.
- (51) Wang, J., Et al. (2002) A unique carbohydrate binding domain targets the lafora disease phosphatase to glycogen. *J. Biol. Chem.* 277: 2377-80.
- (52) Ganesh, S., et al. (2001) Regional and developmental expression of Epm2a gene and its evolutionary conservation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 1046-53.
- (53) TAGLIABRACCI, V.S. ET AL. (2007) Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 104: 19262-6.
- (54) Worby, C.A.; Gentry, M.S. and Dixon, J.E. (2006) Laforin, a dual specificity phosphatase that dephosphorylates complex carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 281: 30412-8.
- (55) FERNANDEZ-SANCHEZ, M.E. ET AL. (2003) Laforin, the dual-phosphatase responsible for Lafora disease, interacts with R5 (PTG), a regulatory subunit of protein phosphatase-1 that enhances glycogen accumulation. *Hum. Mol. Genet.* 12: 3161-71.
- (56) Chan, E.M. et al. (2003) Genetic mapping of a new Lafora progressive myoclonus epilepsy locus (EPM2B) on 6p22. *J. Med. Genet.* 40: 671-5.
- (57) Chan, E.M. et al. (2003) Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Genet.* 35: 125-7.
- (58) Freemont, P.S. (2000) RING for destruction? Curr. Biol. 10: R84-7.
- (59) PICKART, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 503-33.
- (60) HERSHKO, A. ET AL. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* 258: 8206-14.
- (61) Sun, L. and Chen, Z.J. (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 119-26.
- (62) Gentry, M.S.; Worby, C.A. and Dixon, J.E. (2005) Insights into Lafora disease: malin is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates and promotes the degradation of laforin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 8501-6.

- (63) LOHI, H. ET AL. (2005) Novel glycogen synthase kinase 3 and ubiquitination pathways in progressive myoclonus epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* 14: 2727-36.
- (64) FERRER, J.C. ET AL. (2003) Control of glycogen deposition. *FEBS Lett.* 546: 127-32.
- (65) Gomis, R.R. et al. (2002) Liver glycogen synthase but not the muscle isoform differentiates between glucose 6-phosphate produced by glucokinase or hexokinase. *J. Biol. Chem.* 277: 23246-52.
- (66) SKURAT, A.V.; DIETRICH, A.D. AND ROACH, P.J. (2000) Glycogen synthase sensitivity to insulin and glucose-6-phosphate is mediated by both NH2- and COOHterminal phosphorylation sites. *Diabetes*. 49: 1096-100.
- (67) VILLAR-PALASI, C. (1991) Substrate specific activation by glucose 6-phosphate of the dephosphorylation of muscle glycogen synthase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1095: 261-7.
- (68) SKURAT, A.V.; WANG, Y. AND ROACH, P.J. (1994) Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 269: 25534-42.
- (69) MacAulay, K. et al. (2003) Use of lithium and SB-415286 to explore the role of glycogen synthase kinase-3 in the regulation of glucose transport and glycogen synthase. *Eur. J. Biochem.* 270: 3829-38.
- (70) Brady, M.J. and Saltiel, A.R. (2001) The role of protein phosphatase-1 in insulin action. *Recent Prog. Horm. Res.* 56: 157-73.
- (71) Printen, J.A.; Brady, M.J. and Saltiel, A.R. (1997) PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. *Science*. 275: 1475-8.
- (72) ALLAMAN, I.; PELLERIN, L. AND MAGISTRETTI, P.J. (2000) Protein targeting to glycogen mRNA expression is stimulated by noradrenaline in mouse cortical astrocytes. *Glia*. 30: 382-91.
- (73) Greenberg, C.C. et al. (2003) Protein targeting to glycogen overexpression results in the specific enhancement of glycogen storage in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278: 30835-42.
- (74) SCHLAMOWITZ, M. (1951) On the nature of rabbit liver glycogen. II. Iodine absorption spectrum. *J. Biol. Chem.* 190: 519-27.
- (75) VILCHEZ, D. ET AL. (2007) Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy. *Nat. Neurosci.* 10: 1407-13.
- (76) Lee, D.H. and Goldberg, A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8: 397-403.

- (77) Solaz-Fuster, M.D. et al. (2007) Regulation of glycogen synthesis by the laforin-malin complex is modulated by the AMP-activated protein kinase pathway. *Hum. Mol. Genet.*
- (78) Roach, P.J. and Larner, J. (1976) Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. II. Enzyme phosphorylation state and effector concentrations as interacting control parameters. *J. Biol. Chem.* 251: 1920-5.
- (79) SALAVERT, A. ET AL. (1979) Multiple phosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-1. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties. *FEBS Lett.* 106: 279-83.
- (80) Swanson, R.A. and Choi, D.W. (1993) Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation *in vitro*. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 13: 162-9.
- (81) Magistretti, P.J. and Allaman, I. (2007) Glycogen: a Trojan horse for neurons. *Nat. Neurosci.* 10: 1341-2.
- (82) SINGHRAO, S.K., ET AL. (1995) A functional role for corpora amylacea based on evidence from complement studies. *Neurodegeneration*. 4: 335-45.
- (83) Huang, L. et al. (2004) Accumulation of high-molecular-weight amylose in Alzheimer's disease brains. *Glycobiology*. 14: 409-16.
- (84) Leel-Össy, L. (1991) Pathological significance and characteristics of corpus amylaceum. *Neuropathology*. 11: 105-114.
- (85) SINGHRAO, S.K.; NEAL, J.W. AND NEWMAN, G.R. (1993) Corpora amylacea could be an indicator of neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 19: 269-76.
- (86) Loiseau, H. et al. (1992) Occurrence of polyglucosan bodies in temporal lobe epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 55: 1092-3.
- (87) LOISEAU, H. ET AL. (1993) Polysaccharide bodies: an unusual finding in a case of temporal epilepsy. Review of the literature. *Rev. Neurol. (Paris)*. 149: 192-7.
- (88) MacKenzie, J.M. (1993) Polyglucosan bodies are not an unusual finding in temporal lobe epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 56: 577.
- (89) Dalsgaard, M.K. et al. (2007) High glycogen levels in the hippocampus of patients with epilepsy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27: 1137-41.

12. El ojo, ventana al sistema nervioso central

CONCEPCIÓN SANTANO SÁNCHEZ Y JESÚS PINTOR JUST

RESUMEN

La retina es la única parte del cerebro que podemos observar a simple vista por lo que puede convertirse en una ventana a lo que sucede en el interior de nuestras cabezas sin la necesidad de realizar ningún tipo de intervención especial. Multitud de procesos tienen un reflejo en la retina, la cual sufre cambios, en muchos casos muy acentuados, que conllevan trastornos visuales tendentes a la ceguera en la mayoría de los casos. En este ámbito las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la enfermedad de Huntington o la esclerosis múltiple, entre otras, no sólo muestran alteraciones en la retina sino que en muchas ocasiones aparecen disfunciones visuales que se encuentran, sin duda alguna estrechamente relacionadas con cambios en el comportamiento, la pérdida de memoria o deficiencias en la realización de tareas tan habituales en la vida cotidiana como leer. El presente capítulo pretende hacer una descripción de cómo es la retina, su estructura y sus transmisores así como de qué modo se ve alterada en las mencionadas enfermedades neurodegenerativas. Una gran parte de los problemas que tienen los pacientes con estas patologías se deben a varios factores como una falta de equilibrio en los neurotransmisores retinianos, problemas con determinados factores de transcripción o por la existencia de mutaciones en proteínas que traen consigo cambios funcionales y anatómicos responsables de numerosas disfunciones visuales.

Palabras clave: Retina. Glía. Neurotransmisores. Neurodegeneración.

ABSTRACT

The eye, the window to the Central Nervous System

The retina is the only part of the brain that can be directly observed therefore being a window to what is going on within our heads without the necessity of any type of intervention. Many processes have a response in the retina which suffers from changes, many often acute changes, bringing visual impairments leading to blindness. In this sense, neurodegenerative diseases such as Parkinson, Huntington disease or multiple sclerosis, they show changes in the retina but apart from that some changes are related to the behaviour, memory or the impossibility of developing some tasks such as reading. The present chapter tries to make a description of how is the retina in its structure, transmitters and also how it is altered when some neurodegenerative diseases are present. An important number of problems quoted by patients are due to different factors such as an imbalance of neurotransmitters in the retina, problems with some transcription factors or the existence of mutations bringing all of them functional and anatomical changes responsible of a big number of visual disfunctions.

Keywords: Retina. Glia. Neurotransmitters. Nerodegeneration.

La retina es una porción del sistema nervioso central (SNC) que se desarrolla a partir del diencéfalo embrionario (1-2) siguiendo el mismo patrón básico de mitosis, migración vertical y diferenciación. Su función es recibir las señales luminosas para después transformarlas en impulsos nerviosos que son enviados al encéfalo a través del nervio óptico.

Abreviaturas: SNC, sistema nervioso central; EP, epitelio pigmentado; CNE, capa nuclear externa; SF, segmentos de los fotorreceptores; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CFNO, capa de fibras del nervio óptico; NMDA, N-metil D-aspartato; NT, neurotransmisor/es; GABA, ácido γ-aminobutírico; DA, dopamina; VGLUT1, isoforma 1 del transportador vesicular de glutamato; VGLUT3, isoforma 2 del transportador vesicular de glutamato; VGLUT3, isoforma 3 del transportador vesicular de glutamato; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato; AMPA, α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato; EAAT, Transportador de aminoácidos excitadores (glutamato); GAT, transportador de GABA; GAD, glutamato descarboxilasa; GlyT, transportador para glicina; VMAT, transportador de vesículas monoaminérgicas; D1, Receptor de dopamina tipo 1; D2, Receptor de dopamina tipo 2; RNAm, ácido ribonucleico mensajero; EH, enfermedad de Huntington; EM, esclerosis múltiple; MPTP, 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidroxipiridina; SNc, sustancia negra compacta; GB, ganglios basales; 6-OHDA, 6-hidroxidopa-

Tiene una estructura relativamente sencilla y su arquitectura celular está bien caracterizada. Al igual que en otras partes del SNC, la diversidad de tipos celulares es extraordinaria. De hecho, en la retina de mamíferos se pueden distinguir hasta más de 50 tipos neuronales en base a sus características morfológicas, bioquímicas y funcionales (3). El estudio a nivel celular y molecular de la retina de mamíferos ha permitido ampliar nuestros conocimientos acerca de procesos que también se producen en otras zonas del SNC, como la neurogénesis, la apoptosis o la neurotransmisión (4-6). Además, al ser una porción del SNC bastante accesible facilita la manipulación experimental, lo cual la convierte en un excelente modelo para la investigación del tejido nervioso.

La investigación de las neuropatologías oculares puede aportarnos información sobre distintos aspectos de la neurotransmisión, la neurofisiología o sobre los mecanismos moleculares y/o genéticos implicados en la muerte celular, la respuesta de las células gliales, etc, que son comunes en diferentes enfermedades del SNC. No debemos olvidar que la retina es la única parte del cerebro que podemos ver a «simple vista», por lo que puede ser una buena diana terapéutica para el tratamiento de patologías que afectan a otras partes del SNC como son las enfermedades neurodegenerativas.

LAS CÉLULAS DE LA RETINA

La retina está aislada del resto de estructuras oculares por dos membranas limitantes, la interna (formada por uniones no especializadas entre los pies vítreos de las células de Müller) y la externa (formada por uniones especializadas entre los segmentos internos de los fotorreceptores y las prolongacio-

mina; MPDP+, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3-dihidroxipyridinium; MPP+, 1-methyl-4-phenyl-pyridinium; Bcl-2, protoncogén Bcl-2; PERG, patrón del electrorretinograma; VEP, potenciales evocados visuales; SCA7, ataxia espinocerebelar de tipo 1; FT, factores de transcripción; Htt, huntingtina; Rho, rodopsina; Rhok, rodopsina kinasa; Gnat1, subunidad a de la transducina de bastones; Pdeb6, subunidad b de la fosfodiesterasa de bastones; Gnat2, subunidad a de la transducina de conos; Arr3, Arrestina de los conos; Cxr, gen homeobox cono-bastón; Nrl, proteína zipper leucina de la retina neural; Nr2e3, receptor nuclear Nr2e3; Nur, receptor nuclear Nur; Pax6, gen box paired 6; Optx2, homeobox óptico tipo 2; Stat3, transductor de señales y activador de la transcripción tipo 3; AXTN7, ataxina tipo7; PN, postnatal; EA, enfermedad de Alzheimer; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; ST, Síndrome de Tourette.

nes externas de las células de Müller). Externamente a la membrana limitante externa se encuentran los segmentos de los fotorreceptores, las prolongaciones de las células del epitelio pigmentado (EP) y los *microvilli* de las células de Müller.

Los somas de las neuronas y de las células gliales de la retina se disponen en tres capas nucleares y sus prolongaciones forman dos capas plexiformes y la capa de fibras del nervio óptico (Figura 1B). Estas son:

- 1. Capa nuclear externa (CNE) donde se agrupan los somas de los fotorreceptores, los conos y los bastones (Figura 1A, B y C). Son células altamente especializadas capaces de transformar la energía luminosa en energía química, proceso que es conocido con el nombre de fototransducción.
- **2.** Capa plexiforme externa (CPE) formada por los contactos sinápticos entre las prolongaciones internas de los fotorreceptores y las prolongaciones de las células horizontales, bipolares e interplexiformes.
- **3.** Capa nuclear interna (CNI) en la que se encuentran los núcleos de las células horizontales, bipolares, amacrinas, interplexiformes, ganglionares desplazadas o células de Dogiel y los de las células de Müller (glía).

En su parte más externa se encuentran las células horizontales (Figura 1A, H). Sus dendritas se extienden por la CPE donde establecen sinapsis con los terminales axónicos de los fotorreceptores y con las dendritas de las células bipolares e interplexiformes. Se han descrito dos tipos de células horizontales, un tipo sin axón y otro tipo con axón con una arborización terminal (7), en la retina de de algunas especies de mamíferos (8-14).

Dependiendo del tipo de fotorreceptor con el que sinaptan a nivel de la CPE, las células bipolares (Figura 1A, Bc y Bb) se clasifican en bipolares para conos (sinaptan exclusivamente con conos) y bipolares para bastones (sinaptan únicamente con bastones). La prolongación interna de las bipolares para conos sinapta directamente con células amacrinas y ganglionares, mientras que la de las bipolares para bastones sinapta con las amacrinas de tipo II de la retina de mono y de humano.

Los somas de las células amacrinas se encuentra en la CNI (Figura 1A, A), excepto los de las células amacrinas desplazadas (Figura 1A, Ad) que están ubicados en la capa de células ganglionares (CCG). Estas células carecen de axon, excepto algunas amacrinas, llamadas *large-field*, que sí lo tienen (7). Las células amacrinas situadas en la CNI extienden sus dendritas por la CPI y es-

tablecen sinapsis recíprocas con las células bipolares y contactos convencionales con otras amacrinas y con las células ganglionares. También establecen sinapsis con las células interplexiformes, las cuales devuelven la información a la CPE mediante contactos sinápticos con las células horizontales y con las células bipolares (13).

En la CNI también están ubicados los somas de las células ganglionares desplazadas o células de Dogiel que proyectan su axon al núcleo de la raíz óptica basal del sistema óptico accesorio (14), por lo que se piensa que probablemente participen en el control de los movimientos oculares.

- **4.** Capa plexiforme interna (CPI) donde se establecen contactos sinápticos entre las células bipolares, las amacrinas, las ganglionares desplazadas y las interplexiformes por un lado y las células ganglionares y las células amacrinas desplazadas por otro.
- 5. Capa de células ganglionares formada por los somas de las células ganglionares, los de las células amacrinas desplazadas y los de las células gliales.

Sus dendritas salen del polo externo del soma y se extienden por la CPI (Figura 1A, G) donde reciben sinapsis de las células bipolares, las amacrinas y las interplexiformes. Las células ganglionares envían la información visual a través de su axon desde la retina a centros visuales del tálamo (cuerpo geniculado lateral), los cuales se proyectan a la corteza visual.

Las células ganglionares fotorreceptoras constituyen el 1-3% del total de las células ganglionares en las retinas de mamíferos. Su soma se encuentra en la CCG, excepto los de un reducido porcentaje de éstas que se encuentran en la CNI. Sus dendritas se extienden por la CPI y la CNI, respectivamente (15-16). Estas células proyectan su axon al núcleo supraquiasmático y al núcleo pretectal de la oliva (cerebelo). Poseen melanopsina (fotopigmento) y un neuromodulador, el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (17). Se caracterizan por ser células fotosensibles capaces de llevar a cabo el proceso de fototransducción. Estas células juegan un importante papel en la sincronización de los ritmos circadianos, en la modulación de la liberación de melatonina por la glándula pineal y en las respuestas de la pupila a la luz (17). El estudio de de estas células (9-11) nos abre otro área de investigación relacionada con el posible papel funcional de la retina en los ritmos biológicos.

6. Capa de fibras del nervio óptico (CFNO) formada por los axones de todas las células ganglionares, las normalmente situadas y las desplazadas y por

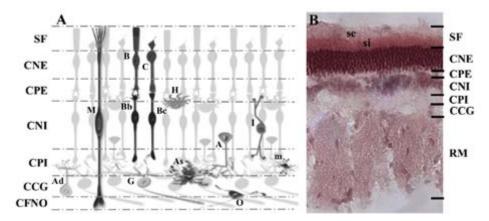


Figura 1. Organización de las células de la retina de mamíferos. A: Dibujo esquemático de las células de la retina. B: Sección transversal de retina de conejo de la raza White New Zeland teñida con PAS-hematoxilina en la que se observan los núcleos teñidos con hematoxilina más intensamente que las capas plexiformes y los rayos medulares (RM). SF, segmentos de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares; Ad, amacrina desplazada; M, célula de Müller; B: bastón; C, cono; Bp, bipolar para bastones; Bc, bipolar para conos; G, ganglionar; H, horizontal; As, astrocito; A, amacrina; O, oligodendrocito; I, interplexiforme; m, microglía; se, segmentos externos; si, segmentos internos.

los axones de las células ganglionares de la retina contralateral y de las vías centrípetas a la retina (18).

Como en el resto del SNC, en la retina hay gran cantidad de células gliales. En ella se encuentra la célula de Müller, un tipo de glía radial que es el más abundante en la retina de los vertebrados. En la retina de algunas especies de mamíferos también se han encontrado células de microglía, astrocitos y oligodendrocitos.

La célula de Müller es la glía mayoritaria de la retina, aproximadamente, el 90% del total de las células gliales de la retina. Son células que se disponen radialmente entre las dos membranas limitantes de la retina y el núcleo se encuentra en la CNI (Figura 1A, M). Su morfología varía en las distintas áreas de la retina, al igual que la expresión de gran cantidad de moléculas de la membrana y del citoesqueleto (19-22).

Se clasifica como glía radial del SNC y tiene características funcionales de célula epitelial, astrocito, microglía, así como de oligodendrocito. Las células de Müller llevan a cabo gran parte de las funciones que los astrocitos desempeñan en el resto del SNC (23-28): provee a las neuronas de nutrientes, parti-

cipa activamente en el mantenimiento de la concentración de K⁺, glutamato, GABA, glicina y posiblemente de otros neurotransmisores, controla el pH extracelular, participa en el control de la transmisión sináptica y en el metabolismo de la vitamina A y sus metabolitos. Estas células son necesarias para la supervivencia de los fotorreceptores y responden de forma variada en múltiples procesos patológicos de la retina (23, 28). Por otro lado, las células gliales de la retina adulta son capaces de desdiferenciarse, proliferar y diferenciarse en nuevos tipos neuronales cuando la retina es dañada con N-metil D-aspartato (NMDA) u ovabaína (29-30).

Los astrocitos (Figura 1A, As) constituyen la glía mayoritaria del SNC, pero en la retina son poco abundantes. Se encuentran en retinas vascularizadas, como la de la musaraña, ratón, rata, gato, mono y humano, o en las áreas vascularizadas de retinas angióticas (parcialmente vascularizadas), por ejemplo la de cobaya, conejo y caballo (31-40). Se piensa que en la retina, los astrocitos serían intermediarios en la comunicación entre los axones de las células ganglionares, los vasos sanguíneos y el cuerpo vítreo (41) y, probablemente, estén involucrados en el desarrollo de los vasos (42).

Los oligodendrocitos (Figura 1A, O) son las células formadoras de la mielina que envuelve los axones del SNC. La mayoría de las retinas de los mamíferos carecen de estas células excepto las retinas con ciertas regiones mielinizadas, como los rayos medulares de la retina de conejo (34, 43-47), o mielinizadas en toda su extensión. La ausencia de estas células en la retina no determina que los axones estén desmielinizados, de hecho, se ha descrito la presencia de mielina en la retina humana (21, 48-53). La mielinización intrarretinal en humanos afecta a menos del 1% de la población, siendo más común en adultos (52-53) y parece estar asociada a algunas patologías oculares.

La microglía de la retina es similar a la del resto del SNC y también se origina a partir del mesodermo. En la retina adulta, las células microgliales se encuentran en las capas más internas de la retina, en la CPI, CCG y CFNO (Figura 1A, m) y están implicadas en procesos inflamatorios y patológicos.

La retina se extiende desde la papila del nervio óptico hasta la ora serrata, próxima a los procesos ciliares. En la retina central humana hay una zona llamada mácula donde la concentración de conos es más alta que en el resto de la retina. En esta zona, las células ganglionares y las células bipolares poseen un pigmento xantófilo, llamada luteína amarilla, que absorbe a longitudes de onda azules y, probablemente, contribuye en la protección de la mácula frente a la formación de los radicales libres.

La mácula comprende la foveola, la fóvea y la región parafoveal. La fóvea se encuentra en el centro de la mácula y se caracteriza porque los fotorreceptores son sólo conos siendo la relación cono:bipolar:ganglionar 1:1:1.

El epitelio pigmentado (EP) se encuentra entre los segmentos externos de los fotorreceptores y la coroides y está constituido por células unidas entre sí por uniones estrechas que forman una monocapa. Debido al tipo de uniones estrechas que existen entre las células del EP, éste actúa como una porción externa de la barrera hematorretiniana. Si se altera la zona de contacto entre los segmentos externos de los fotorreceptores y el EP, las células del EP pueden proliferar y convertirse en metaplásicas. El EP lleva a cabo multitud de funciones, entre ellas la fagocitosis-renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores, el metabolismo de la vitamina A, el control de la difusión de gases y el aporte de nutrientes a los fotorreceptores, entre otras.

LOS NEUROTRANSMISORES DE LA RETINA

El procesamiento de la información visual comienza en la retina y continúa en los centros del tálamo y de la corteza visual. Las señales lumínicas que reciben los fotorreceptores son transmitidas a distintos centros del SNC a través de la vía principal constituida por los fotorreceptores, las células bipolares y las células ganglionares. La información que finalmente llega a los centros talámicos y la corteza previamente es modulada en la retina por las células horizontales, amacrinas e interplexiformes. Para que se establezca dicha comunicación neuronal son necesarios los neurotransmisores (NT), tanto excitadores como inhibidores.

El glutamato, el ácido γ-aminobutírico (GABA), la glicina, la dopamina (DA) y la acetilcolina son los principales neurotransmisores que participan en el procesamiento y en la transmisión de la información visual en la retina de mamíferos. Las distintas conexiones sinápticas que se establecen para ello están bien caracterizadas y definidas, pero la acción de distintos neuropéptidos, neuromoduladores y otros neurotransmisores, como los nucleósidos y nucleótidos, aún está por aclarar.

La transmisión glutamatérgica es crítica en la retina y en otras áreas del SNC y, por ello, cualquier desequilibrio en los niveles de glutamato origina alteraciones funcionales que pueden ocasionar la muerte neuronal y/o afectar a otros sistemas de neurotransmisión, como el gabanérgico, dopaminérgico o el colinérgico (54-55). Algunas enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo: el Alzheimer, el Parkinson, el Huntington, etc, están asociadas con un exceso o un déficit de DA en determinados centros del SNC aunque, en los últimos años, se está viendo que la retina también está alterada en este tipo de patologías (56).

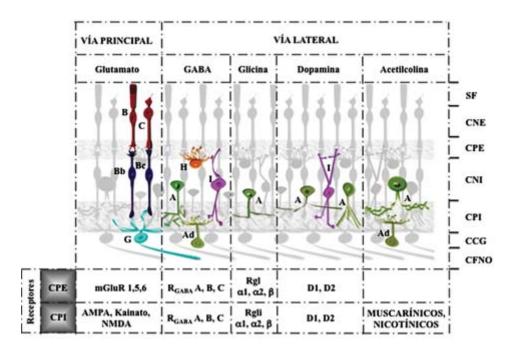


FIGURA 2. Representación esquemática de los principales sistemas de neurotransmisión en la retina de mamíferos. En la tabla inferior se resume la distribución de los principales receptores en las capas plexiformes (CPE y CPI), los cuales están implicados en la comunicación neuronal de la retina. B, bastón; C, cono; Bb, bipolar para bastones; Bc, bipolar para conos; G, ganglionar; H, célula horizontal; A, célula amacrina; I, célula interplexiforme; Ad, célula amacrina desplazada.

Glutamato

El glutamato es el neurotransmisor excitador más importante en la vía de transmisión de la información visual principal o vertical de la retina (Figura 2). Todos los tipos de fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares y las ganglionares liberan glutamato. Este neurotransmisor se almacena en vesículas para transportarlo hasta los terminales presinápticos, permitiendo así controlar la liberación del gutamato y, en definitiva, la transmisión glutamatérgica. En los fotorreceptores y las células bipolares se expresa la isoforma 1 del transportador vesicular de glutamato (VGLUT1) (54, 57, 58) y la isoforma 2 (VGLUT2) en las células ganglionares (57). Además, se han identificado la isoforma 3 (VGLUT3) en un tipo de células amacrinas (54).

En la retina, como en otras áreas del SNC, nos encontramos con una gran diversidad de receptores de glutamato, tanto metabotrópicos como ionotrópicos.

Incluso, en un mismo tipo celular se expresan diferentes isoformas y/o subtipos de un determinado receptor, por ejemplo: en las células bipolares se han idetificado las isoformas 1, 5 y 6 del receptor metabotrópico (mGluR) y de los ionótropicos, el receptor de kainato, α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA) y NMDA (54, 57). Algunas células amacrinas expresan la isoforma 2 de los receptores metabotrópicos (54) y NMDA (57), mientras que en las células ganglionares se han encontrado los receptores AMPA y kainato y en las horizontales el receptor AMPA (54, 57, 59). Las células de Müller también expresan distintos tipos de receptores glutamatérgicos, por ejemplo: el receptor NMDA se ha encontrado en Müller de retina humana (54, 60), y el receptor AMPA en las Müller y los astrocitos de la retina de conejo (54, 27). Estudios electrofisiológicos realizados en células de Müller en cultivo y utilizando agonistas para estos dos tipos de receptores hacen pensar que la célula de Müller regularía las concentraciones extracelulares de K⁺, Na⁺ y de Ca²⁺, lo cual afectaría a la excitabilidad neuronal (27, 60).

El glutamato que se encuentra en la hendidura sináptica se recaptura a través de transportadores, evitando así la hiperexcitabilidad neuronal. Se han identificado 5 tipos de transportadores de alta afinidad para el glutamato (EAAT, «excitatory amino acid transporter») en base a su secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN), propiedades farmacológicas y el tipo de canal. A partir de estudios electrofisiológicos y bioquímicos se ha determinado la localización de estos transportadores en la retina. Así pues, el EAAT1, también denominado GLAST1, se expresa mayoritariamente en las células de Müller. El glutamato y un ión de Na⁺ se unen al EAAT1 y se transporta el glutamato acoplado a una corriente de Cl hacia el interior de la célula de Müller. El EAAT2 o GluT-1 se encuentra en células bipolares y en los conos, el EAAT3 en células horizontales, amacrinas, bipolares y ganglionares y el EAAT5 en fotorreceptores y bipolares (27, 54, 61, 62). La función de estos transportadores sería el aclaramiento del glutamato pero en el caso del EAAT1 se cree que también estaría relacionada con el control de las concentraciones iónicas del espacio extracelular, así como, del pH (27, 61, 62). Dado que la función de estos transportadores es tan importante, su alteración o anomalía está estrechamente ligada a numerosos desórdenes neurológicos (ver Tabla 1), como sucede en el glaucoma o procesos isquémicos de la retina asociados con la disminución de EAAT1 en la retina (54, 55).

La transmisión glutamatérgica en la retina también es modulada a través de la D-serina liberada por las células gliales. La activación de los re-

↓ EAAT1 en la capa molecular del cerebelo, ↑ EAAT1 en células de Purkinje y en células de la capa granular y ↓ EAAT4 Epilepsia 16bulo temporal: ↑EAAT3 en gránulos de células hipocampales, ↓ EAAT2 en el hilus y en la región CA1, ↑ TABLA 1. Implicación de los EAATs en desórdenes neurológicos. Tomado de Beart y col (57). Expresión neuronal aberrante de EAAT1 y EAAT2 asociada con la acumulación de la proteína tau 1 anomalías en el splicing del RNAm del EAAT2 en el lóbulo temporal. Cambios en el SNC humano Polimorfismo del promotor de EAAT2 asociado con ↑ [Glutamato]. ↑ [Glutamato] en el hipocanpo durante los ataques epilépticos. ↓ Recaptura de glutamato en el caudado y en el putamen. ↓ Recaptura en la corteza cerebral y ↓ EAAT2. ↑ [Glutamato] en el fluido cerebroespinal. ↓ ARNm de EAAT2 en el nigroestriado. ↓ Recaptura de glutamato en el SNC. ↑ [Glutamato] en el plasma. EAAT1 en la región CA2/3. en células de Purkinje. ↓ EAAT2 en el SNC. Enfermedad de Huntington Encefalopatía hipóxicaisquémica neonatal **Esclerosis lateral** Daño isquémico Enfermedad amiotrófica Alzheimer Epilepsia

Tabla 1. Implicación de los EAATs en desórdenes neurológicos. Tomado de Beart y col (57). (Continuación).

Enfermedad	Cambios en el SNC humano
	† [Glutamato] en el suero.
	↑ [Glutamato] en la sustancia blanca.
Esclerosis multiple	↓ EAAT1 y EAAT2 en oligodendrocitos.
	↓ EAAT1/2/3 en el SNC.
	↑ ARNm de EAAT1 y de EAAT2 en el nervio óptico.
Enfermedades	† [Glutamato] en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética y glaucoma.
refinianas/Glancoma	† [Glutamato] en el humor acuoso en pacientes con oclusiones de la arteria retiniana.
	↓ EAAT1 en el ojo de pacientes con glaucoma.
Desórdenes	↑ ARNm de EAAT1 y EAAT2 en el tálamo de pacientes con esquizofrenia.
neurosiquiátricos	↓ ARNm de EAAT3/4 en el estriado de pacientes con trastorno bipolar.
	↓ ARNm de EAAT3 en el estriado de pacientes con esquizofrenia.
	↓ ARNm de EAAT4 en el estriado de pacientes con depresiones graves.
	↑ Proteínas que interaccionan con ARNm de EAAT3 y EAAT4 en el tálamo de pacientes con esquizofrenia.
	↑ ARNm de EAAT2 en la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos no tratados.

ceptores NMDA requiere, además del glutamato, la presencia de un coagonista que se une al sitio de unión de la glicina del receptor, siendo la D-serina el ligando endógeno que se une a este sitio (63, 64). Las células de Müller y los astrocitos de la retina sintetizan D-serina ya que poseen serín racemasa, enzima necesaria para la producción de ésta. Experimentos fisiológicos han demostrado la gran relevancia de la D-serina en la transmisión mediada por receptores NMDA (65). La administración de D-serina potencia los potenciales postsinápticos excitadores en las células ganglionares que se producen tras la activación de este receptor, mientras que al tratar con D-amino ácido oxidasa, que degrada la D-serina, se produce el efecto contrario (65).

GABA

El GABA, principal NT inhibidor del SNC, es liberado por distintas poblaciones de células amacrinas, aproximadamente, el 55% de las células amacrinas de la retina de rata y de humano (66, 67), por algunas células amacrinas desplazadas, por las células interplexiformes y por las células horizontales de la retina de mamíferos (Figura 2). Algunas subpoblaciones de células amacrinas gabaérgicas liberan serotonina (amacrinas A17), acetilcolina (amacrinas starburst), dopamina (amacrinas A18) o neuropéptidos como la sustancia P (amacrinas A22) (7, 59, 68, 69). La transmisión gabaérgica se conoce bastante bien a nivel de las células amacrinas (Figura 2).

Una vez sintetizado el GABA es almacenado en vesículas (VGAT, «vesicular GABA transporter) para liberarlo después al espacio sináptico. En la retina de conejo, de mono (27) y en la de rata y ratón (27, 57) se han identificado estas vesículas en la CPE y CPI y en algunos somas de la CNI y CCG (27).

Los receptores para GABA que median la comunicación gabérgica son de dos tipos: ionotrópicos de tipo A y C que cotransportan Cl⁻ y metabotrópicos de tipo B que están acoplados a proteínas G y activan canales de K⁺ y de Ca²⁺ (7, 27, 70). En la retina, las células amacrinas e interplexiformes gabaérgicas establecen sinapsis con los terminales de los conos, las dendritas de las células bipolares, de otras amacrinas y de las células ganglionares principalmente a través de receptores GABA A. En el caso de los receptores de tipo B presentan la misma localización que los ionotrópicos, con la excepción de que éstos no se expresan en los terminales de los conos (7). Las células de Müller de mono y

de humano expresan receptores para GABA de tipo A, los cuales probablemente estén implicados en la regulación del Cl⁻ del espacio extracelular (27). En cuanto al papel en la modulación inhibitoria de la transmisión de la información visual parece ser que se realiza mayoritariamente a través de receptores para GABA metabotrópicos a nivel de la CPI (71).

El GABA liberado al espacio sináptico es recapturado por transportadores. Se conocen tres tipos de transportadores para GABA (GAT). En la retina de mamíferos se han descrito distintas respuestas farmacológicas de estos sistemas de recaptura en distintos tipos neuronales. Estudios de hibridación *in situ* mostraron que el GAT1 se expresa en células amacrinas, tanto las normalmente situadas como las desplazadas, algunas ganglionares y, a niveles mucho más bajos, en células de Müller (27). El otro transportador mapeado es el GAT3, el cual es muy abundante en las células de Müller y en algunas amacrinas pero, el nivel de expresión en estas últimas es mucho más bajo (27). Éste cotransporta GABA, dos iones Na⁺ y un anión Cl⁻ (72) hacia el interior de la célula de Müller.

Existe una estrecha relación entre el metabolismo del glutamato, la glutamina y el GABA en la que están implicadas la célula de Müller y las neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas (Figura 3). Las células de Müller recapturan la mayor parte del glutamato que se libera en la retina a través de EAAT1 (7, 27) y lo convierten en glutamina mediante la glutamina sintetasa. Ésta es liberada al exterior de la célula glial y, posteriormente, es recapturada por las neuronas glutamatérgicas donde se transforma de nuevo en glutamato mediante un proceso de deaminación. Por otro lado, el GABA es sintetizado a partir del glutamato a través de la glutamato descarboxilasa (GAD) en las células gabaérgicas. El GABA es recapturado por las células de Müller a través de transportador para GABA (GAT) donde se metaboliza a glutamina (7, 27).

Las células de Müller presentan GAT, también se han encontrado receptores GABAA en algunas especies de mamíferos y expresan la enzima GAD que convierte el glutamato en GABA (7). Por tanto, pueden sintetizar GABA aunque se desconoce si el GABA liberado por las células de Müller podría actuar como un gliotransmisor y, de ser así, si influiría en el circuito neuronas gabaérgicas-Müller.

Glicina

Una pequeña subpoblación de células amacrinas sintetiza y libera glicina (Figura 2), aproximadamente, el 40% de la población de células amacrinas de

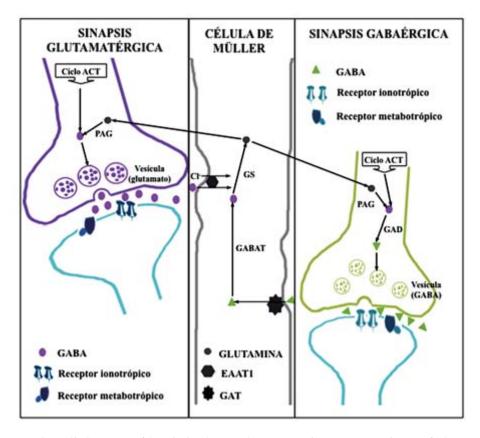


Figura 3. Dibujo esquemático de las interacciones entre las neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas y la célula de Müller. PAG, glutaminasa activada por fosfato; GS, glutamina sintetasa; GABAT, GABA transaminasa; GAD, Glutamato descarboxilasa.

la retina de rata y de humano (66, 67). Algunas de las amacrinas glicinérgicas también almacenan GABA (59).

La glicina se recaptura a través de transportadores localizados en neuronas y en células gliales. De los dos subtipos de transportadores para glicina (GlyT) identificados en otras áreas del SNC, únicamente se ha encontrado el GlyT1 en células amacrinas e interplexiformes de la retina de mamíferos (71).

Los receptores glicinérgicos se han identificado en algunos axones de las células bipolares, en las dendritas de células amacrinas y de las células ganglionares (70-72) y en las células de Müller (7, 70). Los receptores glicinérgicos son heteroméricos, y por el momento, las subunidades identificadas en la

retina de mamíferos son la $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β . Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado que las subunidades del receptor de glicina presentan diferente distribución en los terminales postsinápticos de las células bipolares, amacrinas e interplexiformes (70). Este diferente patrón de distribución de los subtipos de receptores glicinérgicos en distintos tipos de neuronas podría estar relacionado con distintas acciones implicadas en la modulación de las vías de transmisión glutamatérgica y gabaérgica.

La transmisión glicinérgica es mediada por receptores permeables al ión Cl⁻ y es mayoritariamente inhibitoria, aunque dependiendo de si el gradiente de iones Cl⁻ es positivo o negativo respecto al potencial de membrana en reposo también puede ser excitadora (71). Sin embargo, su acción excitadora es bastante desconocida por el momento.

Dopamina

Otro de los neurotransmisores presentes en la retina es la DA. Las neuronas que contienen dopamina son las células interplexiformes y las células amacrinas, ubicadas en su gran mayoría en retina central. En el caso de la retina de mono y de humano se pueden diferenciar dos subtipos de células amacrinas dopaminérgicas, las de tipo I y tipo II (Figura 2). En concreto, las de tipo I sinaptan con otras amacrinas a nivel de la CPI y modulan la información visual que se transmite a través de la vía de transmisión vertical que se establece entre los bastones, las células bipolares y las ganglionares. Las amacrinas de tipo II se caracterizan por su árbol dendrítico en la CPI y sinaptan con células bipolares y ganglionares. Las células de Müller expresan tirosin hidroxilasa y Ldopa descarboxilasa, enzimas implicadas en la síntesis de la DA. Al menos durante el desarrollo embrionario sintetizan este neurotransmisor (73), pero todavía no se sabe con certeza si la célula de Müller adulta también participa en la transmisión dopaminérgica (73).

Tras la síntesis de DA, ésta se almacena en vesículas y se transporta hasta los distintos sitios de liberación situados en las dendritas de las células amacrinas y en las prolongaciones de las interplexiformes. De los dos subtipos de vesículas (VMAT, «vesicular monoamine transporter») que se conocen, en la retina se expresa el de tipo 2 (Figura 4).

En la retina de mamíferos se han encontrado receptores dopaminérgicos de tipo 1 (D1) y de tipo 2 (D2). Los receptores D1 están ubicados principalmente en prolongaciones de las células horizontales en la CPE y de las células ama-

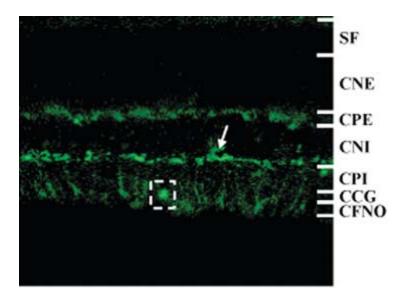


Figura 4. **Distribución de VMAT2 en la retina de ratón.** La **flecha** señala el marcaje en un soma situado en la CNI y que corresponde a una célula amacrina. El **recuadro** indica el marcaje inespecífico en un vaso de la CCG.

crinas en la CPI y en el soma de las células ganglionares (7, 59). Los receptores D2 se encuentran en los terminales axónicos de fotorreceptores en la CPE, en la MLE y en el EP (7, 59). Por otro lado, las células amacrinas dopaminérgicas de la retina de rata y de humano también sinaptan con células ganglionares fotorreceptoras (73, 74) y se piensa que la DA modularía la función de las ganglionares fotorreceptoras a través de los receptores D2. Las células de Müller expresan receptores D1 y D2 (28).

La DA se libera continuamente y su síntesis y renovación están estrechamente relacionadas con la luz y con los ritmos circadianos, de hecho, la liberación de DA es máxima en condiciones de luz y mínima en oscuridad. La ritmicidad en la producción y en la liberación depende de la interacción entre los fotorreceptores y la melatonina con las neuronas dopaminérgicas (73). En ratones balb/c (no sintetizan melatonina) se ha observado que en condiciones de oscuridad no se produce DA en la retina (76). Por otro lado, los ratones C3H/rd que presentan degeneración en los bastones, tienen alterada la ritmicidad de la síntesis de DA en la retina aunque continúan sintetizando melatonina (77). Los resultados de otros trabajos (78) sugieren que la melatonina inhibiría la liberación de DA interaccionando directamente con receptores localizados en las células amacrinas dopaminérgicas o

bien a través de la activación de células gabaérgicas que liberarían GABA y mediante la acción inhibitoria de este último se inhibiría la liberación de DA.

La DA se libera tras el proceso de fototransducción y modula la señal transmitida desde los fotorreceptores a las células ganglionares. Tiene múltiples y complejas funciones, de manera que puede actuar como un mensajero químico durante el proceso de adaptación a la luz, disminuir el acoplamiento eléctrico entre las células horizontales e incrementar el flujo de corriente a través de receptores AMPA situados en los terminales axónicos de los fotorreceptores, así como, modular y participar en el procesamiento e integración de la información visual a nivel de la CPI (73). Además, la DA puede realizar funciones tróficas durante el crecimiento ocular, procesos de muerte neuronal, etc. (79).

Acetilcolina

La acetilcolina es sintetizada y liberada por las células amacrinas *starbrust*, que también liberan GABA, y por células amacrinas desplazadas (Figura 2).

La transmisión colinérgica es mediada por receptores muscarínicos (metabotrópicos), que en el caso de las células amacrinas *starbrust* actúan como autorreceptores, y nicotínicos (ionotrópicos) ubicados en células amacrinas y ganglionares (56, 60). Las células amacrinas *starburst* modulan la información codificada por las células ganglionares desde el punto de vista del componente dinámico de la dirección de los estímulos lumínicos (80).

Nucleósidos y nucleótidos de purinas

La adenosina y el ATP son los nucleósidos y nucleótidos de purinas más representativos que se liberan en la retina y ejercen importantes funciones en la fisiología ocular a través de los receptores P1 y P2, respectivamente.

Los fotorreceptores, las células amacrinas gabaérgicas y colinérgicas y las células ganglionares contienen adenosina. Su liberación está regulada por las condiciones de luz y por ritmos circadianos y puede ser inducida por dopamina y glutamato. La acción de la adenosina es mediada por receptores A1 y A2, los cuales se localizan en la CNI y CCG de la retina de mamíferos y en el caso de los segmentos externos de los fotorreceptores únicamente por receptores A2. Recientemente, se ha identificado el subtipo A3 en las células ganglionares de rata (81).

La adenosina modula los niveles de AMPc en la retina a través de los receptores A1. La coexistencia de adenosina, acetilcolina, GABA y los receptores A1 en la CPI sugiere que la adenosina podría actuar como neuromodulador de estos neurotransmisores. También se ha propuesto un papel neuroprotector en las células ganglionares, ya que cuando se adicionan agonistas de receptores A1 disminuye el daño producido por el NMDA utilizado para generar una isquemia en la retina. Por otra parte, al tratar con agonistas de receptores A3 se previene el aumento de Ca²+ y la muerte celular de las ganglionares que está asociada al receptor purinérgico P2X7 (82) pues induce la apoptosis en las células ganglionares.

El ATP extracelular actúa como neurotransmisor o neuromodulador y su acción es mediada por receptores P2 ionotrópicos (P2X) y metabotrópicos (P2Y). En la literatura (83) nos encontramos con gran cantidad de trabajos en los que se ha estudiado la distribución y la expresión de estos receptores, sin embargo los resultados muchas veces no coinciden creando una gran confusión. La razón de este «caos» es que se han utilizado distintas técnicas, como inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, hibridación *in situ* o RT-PCR, cuyos resultados aportan distinta información y, que en algunos casos pueden llegar a ser contradictorias. Así pues, nos encontramos que la expresión de estos receptores es muy heterogénea en la retina de mamíferos, no sólo por los diferentes subtipos de receptores identificados tanto en las células gliales como en las neuronas sino también en su localización.

Respecto a los receptores P2X, en la retina de gato y de mono (84) se han identificado receptores $P2X_1$ en la CPE y el ácido ribonucleico mensajero (RNAm) del receptor $P2X_2$ se identificó mediante hibridación *in situ* en somas de fotorreceptores y en neuronas de la CNI y de la CCG de la retina de rata (85).

Wheeler-Schilling y col. (86) demostraron mediante técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR que las células ganglionares de la retina de rata expresan receptores P2X₃ y P2X₄. Con el mismo anticuerpo utilizado para detectar P2X₃, también observaron somas marcados en la CNI de secciones de retina de rata (86), que identificaron como células amacrinas y horizontales. Aunque, desde nuestro punto de vista, sería necesario utilizar otros marcadores específicos para descartar la posibilidad de que los somas marcados no fueran de las células de Müller o de las bipolares. En sus resultados puede apreciarse la CPE y la CPI teñida más débilmente que los somas de la CCG con el anticuerpo contra P2X4 y, además, la intensidad de marcaje difiere bastante respecto a la que muestran en sus controles pero, los autores de este trabajo dicen que estas capas no presentan marcaje. En nuestra opinión, consideramos que el marcaje de la CPI y de la CPE sí es específico y pensamos que para asegurar una correcta identificación de cualquier molécula mediante inmunohistoquímica es más recomendable utilizar anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos que con peroxidasa, pues la inmunodetección con fluorescencia es mucho más sensible. Prueba de ello es que en el trabajo de Puthussery y col. (87), observaron marcaje con anticuerpos contra P2X3 en la CPE y en la CPI de la retina de rata y, en este caso, utilizaron inmunofluorescencia.

En la retina de ratón se han identificado por inmunohistoquímica el receptor P2X3 en la CPE, CNI, CPI y CCG, el P2X5 en la MLE, CNI y en la CCG y el receptor P2X6 en la CFNO (88), aunque hemos de señalar que en este trabajo no se hace referencia a un posible marcaje más débil desde la CCG a la CPE.

La expresión y la distribución del P2X7 han sido estudiadas mediante RT-PCR e inmunohistoquímica en la retina de rata. Algunos autores lo han identificado en células amacrinas y en células ganglionares (89), mientras que otros lo han detectado en los terminales de fotorreceptores, los procesos de células horizontales y bipolares y en la CCG (90). Estas discrepancias en los resultados se deben principalmente a que utilizaron distintos anticuerpos para la inmunodetección de P2X7 y probablemente la afinidad de éstos por el epítopo que reconocen en la molécula de P2X7 era diferente.

Se sabe que en la retina de mamíferos se expresan distintos subtipos de receptores P2Y. Fries y col (91) detectaron el ARNm del receptor P2Y, en células ganglionares de la retina de rata, pero algunas de las células que aparecen marcadas en la CCG podrían ser células amacrinas desplazadas. También identificaron el RNAm del P2Y, en la CCG y el de P2Y, y P2Y, en somas de los estratos más internos de la CNI y de la CCG. En este mismo artículo mostraron la detección de P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄ mediante inmunodetección indirecta con peroxidasa. La distribución de P2Y, y de P2Y, no coincidió exactamente con la del RNAm, pues además de la CCG observaron marcaje en la CPI, CPE y en los segmentos internos de los fotorreceptores. Con el anticuerpo contra P2Y₁ también se marcaba la CNE. En cuanto a la distribución de P2Y₄ observaron marcaje en la CPE y en las capas más internas de la retina: la CCG, CPI y CNI. Por otro lado, Pintor y col. (92) mostraron mediante inmunohistoquímica la expresión del receptor P2Y₂ en la CNE y de P2Y₄ y P2Y₆ en todas las capas de retina de rata. Hay que destacar que los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron distintos a los usados por Fries y col. (91), lo cual explicaría las diferencias observadas en la distribución de estos receptores descritas en los dos trabajos que acabamos de comentar.

El receptor P2Y₂ fue identificado por Cowlen y col. (93) en la CCG y en la CNI de la retina de mono y en somas de la CCG, en la CNI y en los segmentos internos de los fotorreceptores de la retina de conejo. Desde nuestro punto de vista, el marcaje descrito en este trabajo corresponde a las capas de la retina que muestran mayor intensidad de marcaje, pero puede apreciarse claramente que el resto de las capas están marcadas aunque con una intensidad mucho más débil (93).

En la retina humana se ha descrito la expresión de receptores P2Y (94). El receptor P2Y₁ se distribuye mayoritariamente por la CFNO, el P2Y₂ en la CFNO, CPI, CNI y la CNE y el P2Y₆ se encuentra en todas las capas de la retina.

Las células de Müller liberan ATP y también expresan receptores P2Y, exactamente: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ Y P2Y₆ (84) y P2X3, P2X4, P2X5 y P2X7 (95, 96).

Las neuronas liberan ATP en respuesta a estímulos lumínicos constantes generando corrientes de Ca²⁺ que se van propagando de una célula de Müller a otra (28). El ATP puede ser liberado con otros neurotransmisores, por ejemplo, las células amacrinas colinérgicas que liberan acetilcolina y ATP. En este caso, el nucleótido actúa modulando la liberación de acetilcolina ya que inhibe a las amacrinas glicinérgicas, las cuales inhibirán la liberación de aceticolina (97). También se ha demostrado que el ATP induce la apoptosis a través de los receptores P2X7 en células colinérgicas durante el desarrollo y en células ganglionares (82). Las células de Müller y los astrocitos modulan la actividad neuronal mediante la liberación de ATP. Utilizando luciferasa se ha demostrado que el ATP liberado por la célula de Müller es transformado en adenosina mediante la cual se inhiben las células ganglionares al provocar un aumento de la conductancia al K⁺ en estas células (62). De hecho, si se administran bloqueantes de la ectoenzima que convierte el ATP en adenosina no se inhiben las células ganglionares porque el ATP no es transformado a adenosina y, además, se sabe que la adenosina actúa a través del receptor A, ya que al administrar DPCPX, antagonista de este receptor, tampoco se inhiben las células ganglionares (72).

LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y LA RETINA

La gran relevancia de la retina en relación con las enfermedades neurodegenerativas se debe a que en enfermedades tan agresivas como el Parkinson, la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis múltiple (EM), entre otras, no sólo la retina está alterada sino que en muchas ocasiones las disfunciones visuales están estrechamente relacionadas con cambios en el comportamiento, la pérdida de memoria o deficiencias en la realización de tareas tan habituales en la vida cotidiana como leer.

Enfermedad de Parkinson

El origen de la enfermedad de Parkinson puede ser muy diverso, de hecho existe una alta incidencia relacionada con el empleo de pesticidas agrarios, como la rotenona, y con una toxina, originada como subproducto en la síntesis de análogos sintéticos de la heroína, 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidroxipiridina (MPTP) (98, 99). En personas con incidencia de Parkinson familiar, las probabilidades de sufrir la enfermedad se incrementan notablemente por lo que se están investigando los genes implicados. La identificación de los genes que confieren susceptibilidad o son causa directa de la enfermedad de Parkinson se les agrupa como genes PARK y se conocen desde el PARK1 al PARK10, numerados por orden de descubrimiento y codificando cada uno de ellos una proteína diferente. Por lo tanto, la etiología del Parkinson no está clara y se han propuesto distintos factores ambientales como el MPTP y la rotenona, así como genéticos, en concreto, mutaciones en el gen de la α-sinucleina, la parkinina, la UCHL-1 («ubiquitin c-terminal hydrolase»), y el DJ-1, relacionado con el sistema proteasómico. Aunque los dos tipos de factores no tienen por qué ser excluyentes, los factores ambientales podrían ser los causantes en los casos de Parkinson que aparecen de forma esporádica mientras que los factores genéticos darían lugar a los de Parkinson hereditario (100-101).

La enfermedad del Parkinson se caracteriza por la disminución de dopamina y por la presencia de inclusiones citoplasmáticas que se denominan cuerpos de Lewis en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta (SNc) y que forman parte de la vía nigroestriatal de los ganglios basales (GB) (102). Estas inclusiones contienen por otras proteínas como la α-sinucleina, la parkinina y la ubiquitina y neurofilamentos. También disminuye el RNAm de las cuatro isoformas de tirosín hidroxilasa que se han encontrado en humanos y de la L-aminácido descarboxilasa implicada en la síntesis de DA (103). Las neuronas dopaminérgicas contienen melanina en situaciones normales pero se ha observado que en pacientes con Parkinson sufren un proceso de despigmentación (104). Además, la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas afecta a otros sistemas de neurotransmisión como el noradrenérgico, serotoninérgicos y colinérgicos (100, 103). Probablemente estos cambios fisiológicos y neuroquímicos se producen por alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial, en el sistema proteasómico y por el efecto neurotóxico de radicales libres, siendo los responsables de las alteraciones motoras que padecen los

pacientes parkinsonianos, como son: movimientos involuntarios rítmicos (temblores), rigidez, bradicinesia, hipocinesia o acinesia, entre otras.

La sustancia negra compacta (SNc) es el área en el que se han centrado las investigaciones sobre los mecanismos que desencadenan esta enfermedad y la aplicación de fármacos para el tratamiento de ésta. Sin embargo, el sistema visual, somatosensorial y periférico también están seriamente dañados. Es más, se ha descrito que la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial disminuye en las neuronas dañadas del SNC y en las plaquetas de pacientes con Parkinson lo cual origina alteraciones en la fosforilación oxidativa y la formación de radicales libres (105). En base a las disfunciones encontradas en la cadena repiratoria mitocondrial algunos autores sugieren que el genoma mitrocondrial podría presentar mutaciones que darían lugar a la formación de toxinas endógenas sistémicas. Por ello, se baraja la posibilidad de considerar esta patología como una enfermedad degenerativa sistémica.

Los pacientes con Parkinson presentan alteraciones visuales complejas que dificultan su capacidad para leer, conducir o mantener el equilibrio y que además están relacionadas con las deficiencias visuocognoscitivas de esta enfermedad (79, 106), resultado de alteraciones electrofisiológicas y neuroquímicas en la retina y en otros centros del SNC, como el cuerpo geniculado lateral y la corteza visual, que afectan sobre todo a la transmisión dopaminérgica implicada en el procesamiento de la información visual. Frederick y col. (107) fueron los primeros que describieron que los niveles de DA en retinas *postmortem* de pacientes parkinsonianos eran más bajos que los de las retinas de personas que no padecían esta patología y se recuperaban los niveles normales cuando los pacientes eran tratados antes de morir con L-DOPA. Estudios posteriores confirmaron estos mismos resultados y observaron alteraciones morfológicas en el plexo perifoveal (108) y una disminución del grosor de la capa de fibras del nervio óptico (CFNO) en la zona ferotemporal alrededor de la papila (109).

En modelos animales en los que se induce el parkinson con neurotoxinas dopaminérgicas, siendo la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (110), el MPTP (106, 111-115) y la rotenona (116) los más utilizados, se han descrito cambios fisiológicos y neuroquímicos similares a los observados en pacientes. Así, en ratas tratadas con inyecciones intraperitoneales de rotenona, un insecticida liposoluble que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria, disminuye el número de amacrinas dopaminérgicas y los niveles de la tirosin hidroxilasa en la retina respecto a los controles (116). Por otro lado, cuando se realizan inyecciones intravítreas de rotenona en la retina de ratón disminuye el número de células ganglionares un 21% y el grosor de de la CFNO un 89% respecto a los controles (117, 118).

La administración sistémica de MPTP produce la disminución e incluso la pérdida de la actividad tirosín hidroxilasa en las células amacrinas dopaminérgicas de la retina (114, 119). Se sabe que el MPTP es una sustancia muy lipofílica y pasa la barrera hematoencefálica. En el SNC, es oxidado por acción de la enzima monoamino oxidasa B (MAO B), que se encuentra preferentemente en los astrocitos y neuronas serotoninérgicas de la SNc, y se convierte en 1-metil-4-plenil-1, 2, 3-dihidroxipiridina (MPDP+), el cual probablemente por oxidación espontánea se transforma en 1-metil-4-plenil-piridina (MPP+), compuesto que sí tiene actividad tóxica (100). Se desconoce si el MPTP se metaboliza en los astrocitos de la retina o en las células de Müller puesto que éstas llevan a cabo muchas de las funciones que desempeñan los astrocitos en el resto del SNC. (Figura 5). El MPP+ se libera al espacio extracelular y pasa al interior de las neuronas dopaminérgicas a través

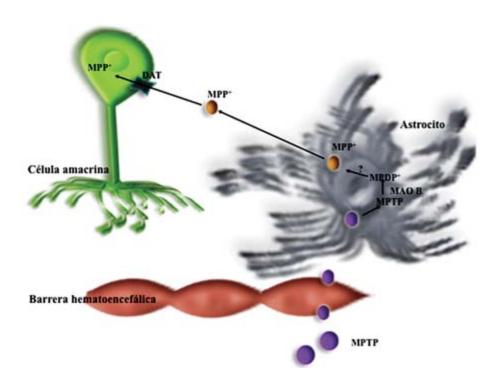


Figura 5. Representación esquemática de una posible ruta metabólica del MPTP a través de los astrocitos de la retina de mamíferos después de la administración sistémica de esta sustancia. No deberíamos descartar que también pudiera ser metabolizado a MPP⁺ en la célula de Müller y, posteriormente, concentrarse en las células amacrinas dopaminérgicas a través del transportador de dopamina (DAT).

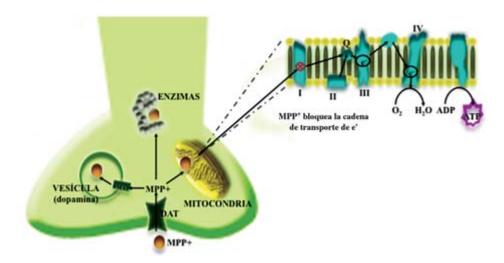


FIGURA 6. Representación de las tres posibles rutas a las que puede incorporarse el MPP⁺ dentro de las células dopaminérgicas: la mitocondria donde inhibe al complejo I de la cadena de transporte electrónica, interaccionando con enzimas del citosol o introduciéndose en las vesículas que contienen dopamina. Basado en Dauer y col (103).

del transportador de DA (DAT, «dopamine transporter») por el que tiene una gran afinidad. En estas neuronas se concentra en las mitocondrias por un proceso activo e interfiere en la cadena de electrones e inhibe el complejo I de la cadena respiratoria provocando la disminución de ATP y la formación de radicales libres. También puede unirse al VMAT2 o interaccionar con distintas enzimas citosólicas, principalmente si tienen carga negativa (100) (Figura 6). La fracción de MPP⁺ que continúa por cada una de estas rutas depende de la concentración de MPP⁺ intracelular, de la afinidad por el VMAT2, de los transportadores mitocondriales y de las enzimas citosólicas (100-101).

En monos tratados MPTP son las células amacrinas de tipo II las más afectadas llegando incluso a perder sus procesos dendríticos y sus apéndices lobulares a través de los cuales liberan la DA (115). También, se reducen las conexiones eléctricas entre estas células y las sinapsis químicas que establecen con las bipolares para bastones. Igualmente se ha demostrado que disminuye la inmunoreactividad en las células amacrinas gabaérgicas y glicinérgicas (115). No sólo las células amacrinas dopaminérgicas están dañadas sino que también se producen cambios en las células de Müller y en las células endoteliales de los capilares de la retina. Chen y col. (114) estudiaron los efectos del MPTP sobre la expresión de Bcl-2 (*B cell limphoma protooncogene*) en la

retina de ratón y encontraron que aumentaba la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y de la glutamina sintetasa (GS) en las células de Müller y de Mac-1 o CD11b (receptor del iC3b) en la microglía, lo que indica que se produce una reacción glial en la retina dañada. También observaron que la expresión de Bcl-2 se incrementaba considerablemente en las células de Müller a los siete días de inyectar el MPTP en el ratón pero a las tres semanas el nivel de expresión volvía a ser similar al de las retinas normales. En el caso de las proteínas Bax, Bad y Bcl-x aumentaba la expresión pero de forma más moderada que la de Bcl-2. El papel de los genes de la familia Bcl-2 sobre la supervivencia celular está muy bien documentada, de hecho, se sabe que estas proteínas tienen efectos anti- y/o proapoptóticos y parece que actúan a través de membrarna mitocondrial alterando su permeabilidad y favoreciendo la salida del citocromo c al citosol (120). En otro estudio también se ha detectado el aumento de la regulación de Bcl-2 y la colocalización de esta proteína y la tirosín hidroxilasa (121). En base al papel antiapoptótico del Bel-2 en otros tipos celulares se piensa que su sobre expresión en las células de Müller en la retina de ratones con Parkinson inducido podría ejercer un efecto de neuroprotección. Las proteínas Bax, Bad y Bcl-x están implicadas en la regulación de la apoptosis, de hecho, Bax y Bad son cofactores que participan en la vía de activación de las caspasas expresándose en el cerebro de pacientes con Parkinson (122) y en animales tratados con MPTP (123).

Entre los defectos visuales característicos que padecen los pacientes con Parkinson se han descrito alteraciones en la latencia del patrón del electrorretinograma (PERG) y en la amplitud de los potenciales evocados visuales (VEP, *«visual evoked potencial»*) (124). En monos tratados con inyecciones intraoculares de 6-OHDA (110, 125) y con inyecciones sistémicas de MPTP (110) también se han detectado estos mismos cambios electrofisiológicos. Estos resultados indican que la modulación de la transmisión glutamatérgica a nivel de las células ganglionares es defectuosa o que la actividad en estas células y en sus axones está alterada en la enfermedad del Parkinson. Por lo tanto, no sólo está alterado la DA sino también el glutamato, probablemente, por la degeneración de las células amacrinas dopaminérgicas.

Desórdenes de poliglutamina

La enfermedad de Huntington (EH) y la ataxia espinocerebelar de tipo 7 (SCA7, *spinocerebellar ataxia type* 7) son enfermedades neurodegenerativas hereditarias que se engloban dentro de los desórdenes de poliglutamina y en los

cuales también se incluyen la atrofia muscular espinobulbar y la atrofia dentatorubro-pallidolusyan, así como, las SCA de tipo 1, 2, 3, 6 y 17 (126, 127). El origen de estos desórdenes es una mutación que da lugar a la expansión de un triplete CAG en el gen afectado en cada una de las enfermedades incluidas en estos desórdenes y que codifica para una secuencia de poliglutaminas en las correspondientes proteínas mutadas. La expansión de poliglutaminas confiere propiedades tóxicas a las proteínas mutadas responsables de interacciones aberrantes entre éstas y con otras proteínas y de su acumulación intranuclear en las neuronas (127, 128). Aunque estos desórdenes comparten características comunes, y, a pesar de que las áreas de expresión de las proteínas mutadas puedan coincidir, el patrón de degeneración neuronal difiere de unos a otros. Por ejemplo, el estriado es la zona del SNC donde se produce principalmente la neurodegeneración en la EH mientras que en la SCA7 es el cerebelo y el tronco cerebral, sin embargo en las dos patologías la retina está alterada.

Estudios realizados en modelos animales que expresan la proteína mutada han revelado que las proteínas mutadas inducen disfunciones neuronales antes de que se produzca la muerte neuronal. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la toxicidad de las expansiones de poliglutamina presentes en las proteínas mutadas como el plegamiento y la degradación de proteínas defectuosas, la alteración de la homeostasis del Ca²⁺, del transporte axonal y/o de la transmisión sináptica (127, 128). Muchos de estos efectos están estrechamente relacionados con situaciones de estrés neuronal. Además, la desregulación de la expresión de diversos genes posiblemente se produzca como resultado del secuestro de factores de transcripción (FT) o de interacciones aberrantes entre las proteínas mutadas y factores nucleares que regulan la expresión génica (129-132).

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad autosómica dominante en la que el exón 1 del gen que codifica para la huntingtina (Htt) tiene mayor número de repeticiones del triplete CAG que en situaciones normales. El gen mutado, llamado IT15, se encuentra próximo al extremo del brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). En individuos sanos puede haber entre 11 y 35 repeticiones del triplete CAG sin que presenten ninguna anomalía mientras que en personas enfermas puede tener entre 37 y 240 repeticiones.

La huntingtina (Htt) tiene un peso molecular de 350 kDa, presenta una expansión de poliglutaminas en la región N-terminal y se expresa en todas las neu-

ronas del SNC y en células no neuronales de otros tejidos (133). Su patrón de expresión no coincide exactamente con el de degeneración neuronal, pues en la Htt mutada (más de 35 repeticiones) forma agregados en el citoplasma y en el núcleo de neuronas del estriado, de la SNc, de la corteza, del tálamo, del hipotálamo (134).

A pesar de no conocerse exactamente su función, se piensa que puede estar implicada en el transporte intracelular y axonal de vesículas y orgánulos o bien en el reciclaje de vesículas, ya que la Htt interacciona con proteínas asociadas a vesículas y al citoesqueleto (135), principalmente con microtúbulos, así como con el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y las mitocondrias (136). También se han propuesto otras posibles funciones relacionadas con la señalización celular mediada por Ca²⁺, pues se ha visto que modula la sensibilidad de los receptores de inositol 1, 4, 5-trifosfato (137), y con la regulación de la apoptosis (138, 139) y de la transcripción (140, 141). Por otro lado, la expresión de Htt es vital en las etapas tempranas del desarrollo embrionario de ratón, de hecho, su ausencia es letal en ratones *knockout* para esta proteína (134).

La EH se caracteriza por la desaparición de neuronas gabaérgicas de proyección de tamaño medio en el estriado, en concreto, en el caudado y en el putamen. Existen dos poblaciones de neuronas gabaérgicas en el estriado, unas que coexpresan encefalinas y la otra subpoblación sustancia P y dinorfina. Pues bien, las que contienen encefalinas son las que primero mueren y las responsables de la sintomatología característica de esta enfermedad (hipercinesia y corea). En los últimos estadíos de la patología, los enfermos con Huntington presentan alteraciones en los movimientos voluntarios lo cual coincide con la muerte de las neuronas gabaérgicas que contienen sustancia P (134). También disminuye la densidad de receptores DA1 y DA2 en las neuronas dopaminérgicas del estriado (142) y, a medida que avanza la enfermedad, se produce la muerte de neuronas piramidales glutamatérgicas, sobre todo de las capas III, V y VI de la corteza motora y asociativa (134, 143).

Las alteraciones visuales asociadas a la EH han sido diagnosticadas mediante tests visuales (144) y en la literatura sólo encontramos un único estudio a nivel histológico de retinas *postmortem* de pacientes con Huntington realizado por Petrasch-Parwez y col. (145), aunque no observaron ningún signo de neurodegeneración en las retinas analizadas. Sin embargo, en los ratones transgénicos que expresan la Htt mutada sí se han detectado alteraciones en la retina. La línea de ratones R6 es la más utilizada en el estudio de la EH, en concreto, los ratones R6/1 y R6/2 en los que la Htt mutada presenta entre 120 y 150 glutaminas en la región N-terminal.

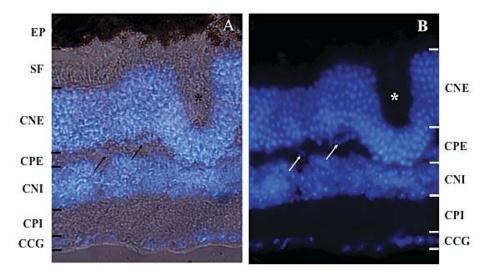


Figura 7. Sección transversal de retina central de ratón R6/2. A: fluorescencia y contraste de fases de los núcleos celulares marcados con DAPI (azul) y de las distintas capas de la retina. B: muestra el mismo campo que A. El asterisco indica una zona de la retina donde se invagina la CNE. Las flechas señalan posibles núcleos de la CNE deslocalizados en la CPE.

La retina de los ratones R6/1 y R6/2 presenta alteraciones a nivel morfológico, sobre todo en la CNE que presenta un grosor bastante irregular y ondulaciones (Figura 7), algunos núcleos de los fotorreceptores se deslocalizan situándose entre la capa de los segmentos y disminuye el grosor de la capa de los segmentos internos y externos (146).

La Htt también se acumula formando cuerpos de inclusión en las capas nucleares de la retina. Además, algunos de los agregados de la CCG contienen chaperonas (Hdj-1 y Hdj-2 y Hsp70) y el factor de transcripción CBP (146).

Estas alteraciones morfológicas se correlacionan con alteraciones electrofisiológicas detectadas en los electrorretinogramas (ERG) realizados a los ratones R6/1 en condiciones escotópicas (respuesta a estímulos lumínicos en condiciones de adaptación a la oscuridad), en los que la amplitud de las ondas a y de las ondas b se reduce en un 50% y en un 70%, respectivamente (146). Estos resultados indican que existe una disfunción de los bastones y de las células bipolares para bastones. En cuanto a las respuestas electrofisiológicas en condiciones fotópicas no se detecta respuesta alguna en el ERG (146), lo que indica que las conexiones sinápticas que se establecen entre los conos y las bipolares para conos están seriamente dañadas. Por lo tanto, estos ratones están prácticamente ciegos.

TABLA 2. Resumen de los genes desregulados en la retina de ratones con SCA7 (R7E) y con huntington (R6/2) y de las funciones en las que están implicados. (—); disminución de la expresión, (+); aumento de la expresión; NS, diferencias no significativas respecto al control. Realizada a partir de los resultados obtenidos por Abou-Slaymane y col (127) y Helmlinger y col (147).

	Gen	R7E	R6/2	Función
BASTONES	Rodopsina (rho)	(—)	(—)	Fototransducción (bastones)
	Rodopsina kinasa (Rhok)	(—)	(—)	
	Sububidad α transducina bastones (Gnat1)	(—)	(—)	
	Sububidad β fosfodiesterasa 6 (Pde6b)	(—)	NS	
	Proteína membrana segmento externo bastones (Rom)	()	(—)	Morfogénesis del segmento externo de los bastones
CONOS	Subunidad α transducina conos (Gnat2)	(+)	(—)	Fototransducción (conos)
	Arrestina cono (Arr3)	(—)	(—)	
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	Gen homeobox conobastón (Crx)	(—)	(—)	Diferenciación y mantenimiento de los conos y de los bastones
	Proteína zipper leucina de la retina neural (Nrl)	(—)	(—)	Diferenciación y mantenimiento de los bastones
	Receptor nuclear (Nr2e3)	(—)	NS	
	Receptor nuclear (Nur)	(—)	NS	Diferenciación y mantenimiento de las neuronas
	Gen box paired 6 (Pax6)	NS	(—)	
	Mab-21-like 1 (Mab2111)	(—)	NS	Desarrollo temprano del ojo
	Homeobox óptico 2 (Optx2)	(+)	NS	
	Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (Stat 3)	(+)	(+)	Proliferación de progenitores de la retina

El fenotipo de los ratones R6/1 y R6/2 que acabamos de describir coincide con la desregulación de la expresión de muchos genes. En concreto, en los ratones R6/2 se produce una regulación a la baja de la expresión de genes que codifican para FT implicados en la diferenciación de los fotorreceptores (127, 147), así como, genes que codifican para proteínas que participan en el proceso de fototransducción de los bastones (127, 147) y de los conos (127) (ver Tabla 2). Estos resultados sugieren que la desregulación de los FT, los cuales a su vez controlan la expresión de genes implicados en el programa de diferenciación de los fotorreceptores, determinaría la aparición de conos y bastones defectuosos en la CNE y por consiguiente se alterarían las demás capas de la retina. Por otro lado, también se ha descrito que en neuronas del estriado de ratones con la EH se produce una regulación a la baja de la expresión de genes que codifican para neurotransmisores, receptores y otras proteínas implicadas en la señalización neuronal (142). Aunque no se ha identificado el mecanismo, se cree que estaría relacionado con la desregulación del gen que codifica para el NRSF (neuron-restrictive silencer), un FT que controla la diferenciación neuronal en los estadíos tardíos del desarrollo. De hecho, en ratones normales, la proteína NRSF se une a REST (represor-element-1 transcription factor) en el citoplasma y posteriormente este complejo (REST-NRSF) interacciona con la Htt con lo se reduce su capacidad para interaccionar con los sitios de unión del complejo (Figura 8) situados en los promotores de los genes que controla y se activa la transcripción de éstos (148, 149). Sin embargo, cuando la Htt está mutada no se produce la interacción con el complejo REST-NRSF por lo que aumentan los niveles de este complejo en el núcleo, así como, la represión de la transcripción de los genes que son regulados por NRSF y los precursores neuronales no se diferencian (148, 149).

Las células de Müller y los distintos tipos neuronales de la retina se generan a partir de precursores neuroepiteliales multipotentes que siguen un patrón temporal y espacial muy conservado en la retina de todos los vertebrados. Las células ganglionares, las células horizontales, los conos y algunos tipos de amacrinas son los que primero se diferencian y más tarde lo hacen los bastones, las células bipolares y las células de Müller (150, 151). Después de que los precursores de los fotorreceptores abandonen el ciclo celular se produce la diferenciación de éstos y es cuando se transcriben los genes de distintos FT como el de Stat3 que controla la expresión del FT Cxr (152) y que junto con el Nrl, (otro FT) regulan la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en la diferenciación, así como, en el proceso de fotoransducción, por ejemplo: la rodopsina (Rho), la transducina (Gnat) o la arrestina (Arr). Por lo tanto,

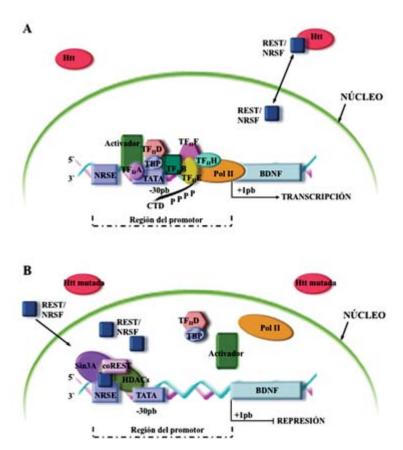


Figura 8. Regulación de la activación de la transcripción de genes que contienen NRSE (neuronal-restrictive silencer element). A: La huntingtina (Htt) puede regular la activación de la transcripción de genes relacionados con la supervivencia neuronal, por ejemplo: el gen del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) a través de su interacción con el complejo REST/NRSF en el citoplasma de manera que disminuye la capacidad de interacción de este complejo con los sitios NRSE y se activa la transcripción. B: La Htt mutada no puede interaccionar con el complejo REST/NRSF por lo que aumentan los niveles de este complejo en el núcleo donde se une con gran afinidad al sitio NRSE y promueve el reclutamiento de los complejos deacetilasa-histona (HDADs)—Sin3A alterando la organización de la cromatina y reprimiendo la transcripción del gen BDNF. Basado en Landles y Bates (149).

la desregulación transcripcional de genes que desempeñan funciones tan importantes como las anteriormente mencionadas determinaría la aparición de las alteraciones morfológicas a nivel de CNE y de anomalías en el funcionamiento de los fotorreceptores. Además, el proceso de sinaptogénesis, la organización de las capas plexiformes y los distintos sistemas de neurotransmisión, princi-

palmente, la vía principal de transmisión en la que está implicada el glutamato, también estarían alterados en los ratones R6/2, aunque por el momento no ha sido estudiado. En base a esto, es muy probable que las cambios electrofisiológicos detectados en los ERG se deban a que estos ratones presentan alteraciones no sólo morfológicas sino también bioquímicas a nivel de los segmentos externos, pues el RNAm de proteínas de la membrana de los segmentos y de otras implicadas en la fototransducción no se expresan correctamente y como los fotorreceptores no siguen su patrón normal de diferenciación se producirían alteraciones en el proceso de sinaptogénesis.

No hay que olvidar que los ratones R6/1 y R6/2 presentan alteraciones en la retina antes del primer día de vida y pasados 5-6 meses la tasa de mortalidad es muy elevada dada la gravedad de los daños neurológicos que presentan. Por el contrario, en humanos la sintomatología aparece generalmente a partir de los 50 años, salvo algunos casos esporádicos, aunque esto no quiere decir que las alteraciones se produzcan coincidiendo con la manifestación de los síntomas.

La expresión de Htt es ubicua en todas las células del organismo y, de alguna manera su función está relacionada con la expresión de FT. Como sabemos, la Htt está mutada en la EH y además se produce la desregulación de los FT que controlan la expresión de genes relacionados con el desarrollo de distintas neuronas del SNC. Por otro lado, se ha encontrado que la expresión de algunos genes específicos está alterada en el músculo estriado de ratones R6/2 (142) y en células sanguíneas de pacientes con huntington se sobre expresa el RNAm de varias proteínas: anexina A1, TAF7, receptor P2Y y ROCK1, entre otras (153). Por lo tanto, ¿podría considerarse la EH como una enfermedad sistémica?

Ataxia espinocerebelar de tipo 7

La ataxia espinocerebelar de tipo 7 (SCA7) es una enfermedad hereditaria dominante que causa ataxia, disfunciones en el tronco cerebral y degeneración de la retina. Esta enfermedad se produce por la mutación del gen SCA7 que codifica para la ataxina 7 (ATXN7) y que tiene entre 38 y 460 glutaminas en la región N-terminal (154).

La ATXN7 es una subunidad que forma parte del complejo transcripcional TFTC/STAGA el cual controla la activación de los promotores de determinados genes (147, 155). Otras proteínas como la acetil transferasa de histonas (GCN5) y FT como el TRRAP, TAF12 y SPT3 también forman parte del complejo TFCT/STAGA (147, 155). La ATXN7 se localiza en el citoplasma y en el nú-

cleo mientras que la forma mutada de esta proteína forma agregados insolubles en neuronas del cerebelo, del tronco cerebral y de la retina (147). Además estos cuerpos de inclusión contienen ubiquitina, subunidades del proteasoma y chaperonas (Hsp70, Hsc70 y Hdj-2), lo cual sugiere que en la SCA7 se produce anomalías en el plegamiento y en la degradación de proteínas (156).

Al igual que en otros desórdenes de poliglutaminas, la edad a la que comienza a manifestarse los síntomas y la severidad de éstos es inversamente proporcional al número de repeticiones del triplete CAG, por lo tanto cuanto menor sea el número de repeticiones menos devastadora es la enfermedad y más tarde aparecen los desórdenes (157-159). En estudios histopatológicos realizados en cerebros *postmortem* de pacientes con SCA7 se ha descrito que en el cerebelo se produce la degeneración de la capa de células de Purkinje, disminuye el número de bastones, conos y células ganglionares y las células del EP migran hacia las capas de la retina (160).

Para estudiar la SCA7 en modelos animales se han utilizado diferentes ratones transgénicos en los que la severidad de las alteraciones de las zonas afectadas difiere, de manera que en los ratones que presentan mayor número de repeticiones (90 glutaminas) en la ATXN7 se reproducen los desórdenes de esta enfermedad mucho más parecidos a los que tienen los pacientes con SCA7, y además las zonas dañadas sólo afectan al cerebelo o a la retina, pero nunca a las dos. Para ello, se han hecho varias construcciones del gen transgénico que se diferencian en el número de repeticiones del triplete CAG y en el promotor que regula su expresión. Así, el transgen es regulado por el promotor pcp-2, que controla la expresión únicamente en células de purkinje, en los ratones P7E (90 repeticiones) y P7N (10 repeticiones) mientras que en los ratones R7E y R7N, con 90 y 10 repeticiones, respectivamente, es controlado por el promotor de la proteína Rho (161). También se han utilizado otros ratones transgénicos que presentan mutaciones en el gen de la ATXN7 y de c-Jun (162), este último está implicado en rutas de señalización relacionadas con situaciones de estrés celular.

Las células de Purkinje del cerebelo de los ratones P7E poseen agregaciones de ATXN7 intranucleares que se encuentran muy próximas al nucleolo en las células de Purkinje y a medida que avanza la enfermedad se reduce la extensión del árbol dendrítico de estas mismas células (161). Los agregados también contienen chaperonas (Hsp40 y Hdj-2) y proteínas del sistema ubiquitina/proteasoma (161). La formación de estas inclusiones no sigue un patrón temporal uniforme, de manera que en las células de Purkinje del lóbulo 9 (úvula) y del 10 (nódulo) aparecen antes que en los lóbulos 1-8 (161).

La ATXN7 también forma agregados en la retina de los ratones R7E, los cuales se localizan en el citoplasma de los fotorreceptores en estadíos más tempranos, día 13 postnatal (PN), que en las células de Purkinje del cerebelo de ratones P7E, donde aparecen un mes después del nacimiento (161). En estadíos más avanzados de la enfermedad, los agregados se distribuyen en el interior del núcleo de los fotorreceptores. En los agregados de ATXN7 también se han encontrado otras proteínas como la ubiquitina, algunas subunidades del proteasoma y la chaperona Hdj-2 (161).

Las respuestas electrofisiológicas de los fotorreceptores de los ratones R7E se ha analizado mediante ERG en condiciones escotópicas. Estos estudios han revelado que la respuesta de los bastones disminuía progresivamente a partir de la quinta semana después del nacimiento hasta que ya no se detecta ninguna respuesta al año y medio después del nacimiento (147). La continua reducción de la respuesta en el ERG coincide con la disminución del grosor de la capa de los segmentos de los fotorreceptores, con las ondulaciones de la CNE y con la presencia de manchas o puntos blancos en la retina, observadas en los exámenes de fondo de ojo realizados a estos ratones (147). Además de estas alteraciones morfológicas, algunos núcleos de los fotorreceptores aparecen deslocalizados en la capa de los segmentos internos y externos, incluso también en la CNI, desde el 75 día postnatal y el número de núcleos de los fotorreceptores disminuye aproximadamente un 30% tras el primer año de vida (161). Por otro lado, mediante inmunohistoquímica se ha observado que la expresión de la proteína Rho y de la arrestina va disminuyendo conforme se reduce la capa de los segmentos externos (161) y los procesos de las células bipolares y las células horizontales, marcados con proteinkinasa C y con calbindina, respectivamente, se extienden por la CNE, sobre todo en las zonas de las invaginaciones de esta capa (161). Por lo tanto, las alteraciones bioquímicas y morfológicas de los segmentos de los fotorreceptores coinciden con los cambios en la organización y en las sinapsis a nivel de la CPE debido a anomalías en el proceso de diferenciación de los fotorreceptores y por consiguiente de un proceso de sinaptogénesis defectuoso.

El fenotipo de la retina de los ratones R7E se correlaciona con los hallazgos encontrados mediante RT-PCR quantitativa y análisis de microarrays (127, 155) en los que se ha detectado la desregulación de genes implicados en la diferenciación de los fotorreceptores y en la fototransducción (ver Tabla 2). Así, la expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción Crx, Nrl y Nr2e3 disminuye en un 51%, 31% y 21%, respectivamente (155). Estos factores controlan la expresión de genes relacionados principalmente con la diferenciación de los bastones. También están desregulados otros genes implicados en el desarrollo

del ojo (Optx2 y Mab2111). La transcripción de los genes que codifican para la fototransducción en los bastones se reduce considerablemente, expresándose un 13% el gen de Rho, un 3% el de Gnat1, un 10% el de Pde6b, un 28% el de Rhok y un 23% el de Rom, entre otras (Figura 9). Respecto a la transcripción de los genes específicos de los conos, también disminuyen, aunque es más elevada que la de los conos, en concreto la de Bcp que se expresa un 43% y Arr3 un 65%, por el contrario el gen de la proteína Gnat2 se sobreexpresa un 113% (155).

Como sucede en la EH nos encontramos de nuevo con una mutación en una proteína que está estrechamente relacionada con la alteración de la transcripción, pero ¿cómo influye la proteína mutada en la expresión génica de los fotorreceptores? Una posible respuesta a esta pregunta la encontramos en los resultados obtenidos por Helmlinger y col. (155), quienes han demostrado que la ATXN7 in-

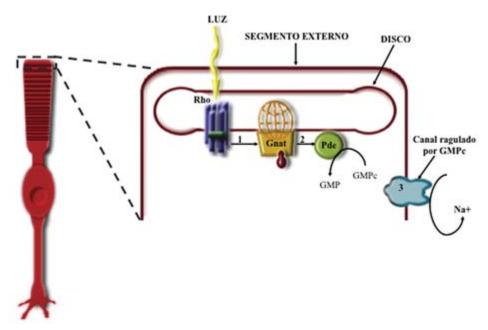


Figura 9. Esquema del proceso de fototransducción en los bastones. El fotón de luz incide sobre la rodopsina (Rho) y da lugar a un cambio conformacional de ésta, lo cual provoca la activación (1) de la transducina (Gnat), que es una proteína G, y posteriormente la activación (2) de la fosfodiesterasa (Pde) y la transformación del GMPc a GMP. Por lo tanto, los niveles de GMPc disminuyen en el citoplasma del segmento externo e inactiva (3) el canal de Na⁺ dependiente de GMPc, con lo que se hiperpolariza el fotorreceptor y no se libera glutamato. En el caso de ratones con SCA7 se produce una regulación a la baja de algunas subunidades de Rho, Gnat y de la Pde, por lo que el proceso de fototransducción está seriamente dañado.

duce la hiperacetilación de la histona H3 y la alteración de la organización de la cromatina, lo cual provoca un aumento del reclutamiento del complejo de transcripción TFTC/STAGA en los promotores de los genes que acabamos de mencionar, de manera que la RNA polimerasa II no puede interaccionar correctamente con los promotores ni con las regiones codificantes de estos genes y se produce la regulación a la baja de la transcripción de éstos (155).

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las demencias más comunes que padecen las personas mayores de 65 años y que se caracteriza por alteraciones cognitivas y del comportamiento así como la pérdida de la memoria.

Nos encontramos ante una enfermedad multifactorial en la que influyen la edad, factores ambientales y factores genéticos. La mayoría de los casos de Alzheimer son esporádicos aunque aproximadamente el 30% de los pacientes tiene algún caso familiar y el 10% presentan una transmisión autosómica dominante. Además, el diagnóstico en las etapas iniciales de la enfermedad es difícil pues la sintomatología varía de unos pacientes a otros, con la excepción de los casos familiares para los cuales existen marcadores genéticos. Los genes implicados en la EA son cada vez más numerosos y pueden clasificarse en 2 grandes grupos, por un lado los genes que desencadenan directamente la enfermedad y que se manifiesta a una edad más o menos temprana (50 años), como el gen de la proteína precursora amiloide y los genes que codifican para la presenilina-1 y presenilina-2 (163). En el otro grupo se incluyen aquellos genes que confieren susceptibilidad genética, por ejemplo: el gen de apoproteína E (APOE) que está relacionado con la homeostasis de los triglicéridos y del colesterol (164), el gen de la α 2-macroglobulina, de la interleukina 1, de la óxido nítrico sintasa, del citocromo CYP2D6, o de la MAO A (165), entre otros, y que por lo general están relacionados con los casos de aparición tardía de la enfermedad (99).

Las principales características de esta patología son la atrofia de la corteza cerebral y la formación de dos tipos de agregados que son los depósitos extranucleares del péptido β-amiloide llamados placas seniles y los ovillos o marañas neurofibrilares constituidos por la proteína tau hiperfosforilada (166). El lóbulo temporal mediano de la corteza es la primera zona del SNC donde se forman las placas seniles y los ovillos neurofibrilares apareciendo al menos 20 años antes de que se manifiesten los primeros síntomas. Posteriormente, también se localizan en otras regiones como en el hipocampo, en el sistema límbico, en áreas asociativas neocorticales y en la corteza visual.

Aunque la función del péptido β-amiloide no está clara, los resultados obtenidos *in vitro* sugieren que podría estar implicada en distintos procesos celulares, entre los que incluyen el crecimiento de neuritas (167, 168), la supervivencia neuronal (169), la adhesión celular (170, 171), el transporte axonal (172, 173), la proliferación (174, 175), la sinaptogénesis (176-182) y la regulación transcripcional (183). Por otro lado, llama la atención que la mutación de la proteína tau no esté asociada con la EA pero que sí pueda originar una demencia frontotemporal con síntomas parkinsonianos caracterizada por la formación de ovillos neurofibrilares pero no de placas seniles (183).

La presencia de placas seniles no se produce solamente en la EA, de hecho, los estudios histológicos *postmortem* realizados en cerebros de personas ancianas que no padecían ningún tipo de demencia han revelado la presencia de estos agregados en las células ganglionares de la retina (185), en la corteza visual primaria (186) y otras áreas del cerebro. También han sido descritos en personas con degeneración macular (163, 187) y en las células ganglionares de la retina de ratas en las que se induce glaucoma (188).

Uno de los sistemas de neurotransmisión más estudiados en relación con la EA ha sido el sistema subcortical colinérgico donde se produce la pérdida de neuronas colinérgicas de axón largo que se localizan en el septum, la banda diagonal de Brocca, el pallidum ventral y el núcleo basal de Meynert y se proyectan a distintas estructuras corticales, el bulbo olfatorio, la amigdala, el hipocampo y otras zonas de la corteza (189-192). La disminución de este sistema de neurotransmisión se ha relacionado con las disfunciones cerebrales que se producen en esta enfermedad, pero es muy probable que estén implicados otros sistemas de neurotransmisión, pues la acción de la acetilcolina está interrelacionada con la de otros neurotransmisores no sólo sobre la neurona con la que conectan sino con otras situadas en otras zonas del SNC.

Los enfermos de Alzheimer presentan problemas visuales entre los que se incluyen defectos en la discriminación del color, alteraciones de la resolución espacial, en la agudeza visual, en el contraste, en las funciones visuoespaciales, etc. Gran parte de estas disfunciones visuales, sino todas, se deben a que la corteza visual asociativa próxima a la corteza visual primaria y la corteza visual asociativa secundaria están atrofiadas. Sin embargo, hay evidencias de que en la retina también se producen alteraciones, por ejemplo disminuye el número de fotorreceptores (193) y el de células ganglionares (193-195) y se reduce el grosor de la CFNO (194, 196). Blanks y col. (195) realizaron un estudio morfométrico *postmortem* de la retina de personas con Alzheimer y observaron que la pérdida de células ganglionares coincidía con la reducción del grosor de la

CFNO. Además, estos autores propusieron que el mecanismo implicado en la pérdida de las células ganglionares en la EA sería distinto al que se produce de forma «natural» por el envejecimiento, ya que encontraron que la disminución del número de células ganglionares en retina central era mayor que en retina periférica mientras que en la retina de personas ancianas normales era al contrario, mayor en periférica y menor en retina central. Es posible que la reducción de la población de células ganglionares se deba a un efecto tóxico de los depósitos de la proteína β -amiloide.

Los estudios electrofisiológicos realizados en pacientes muestran que hay una alteración en la retina. De hecho, se ha detectado que se produce un retraso en la latencia de los potenciales evocados visuales (VEP) y la amplitud del patrón del electroretinograma (PERG) disminuye, siendo ésta más pronunciada para patrones de frecuencia temporal alta (186). Estos resultados indican que la pérdida neuronal es selectiva y serían las células ganglionares de tipo M, las cuales se proyectan al núcleo magnocelular del cuerpo geniculado lateral, pues estas células son más sensibles a las frecuencias temporales altas (197, 198).

Al parecer las deficiencias visuales en los pacientes con Alzheimer no sólo se producen por un procesamiento e integración de la información visual a nivel de la corteza visual primaria y asociativa sino también de la retina, pues es el primer lugar donde comienza a procesarse la información visual y en el caso de la EA está dañada. Por lo tanto, al disminuir el número de fotorreceptores se reduciría la cantidad de estímulos lumínicos que son transformados en estímulos químicos (glutamato) por estas células, así como de toda la información que llegaría a las células ganglionares. Como además también se reduce la población de células ganglionares, la información que finalmente se envía a la corteza visual es menor y, probablemente, esté menos elaborada que en situaciones normales.

Existe una variante visual de la EA (199, 200). En estos casos los problemas visuales se manifiestan desde el primer momento en el que se desarrolla la demencia asociada a esta enfermedad, son además mucho más severos y no se desencadenan por la alteración de otras estructuras del SNC que conectan con la corteza visual. En este caso particular de la EA, la atrofia cortical se produce principalmente en áreas occipitoparietales (200).

Muchos pacientes de Alzheimer sufren con bastante frecuencia alteraciones del comportamiento relacionados con desórdenes de los ritmos circadianos, por ejemplo: delirio, nerviosismo o alteración del ciclo sueño-vigilia (201, 202). Incluso, a veces son tan severos estos desórdenes que se llega a pensar que podrían

contribuir en la demencia (203). Esto es debido a que en los pacientes con Alzheimer disminuyen los niveles de melatonina, lo cual coincide con cambios moleculares e histológicos que se producen en la glándula pineal, como la formación de ovillos neurofibrilares y de placas seniles, con las alteraciones en el control autónomo de la glándula pineal debido a que disminuye el RNAm del receptor β adrenérgico en los pinealocitos (204-205) y con la sobre expresión del gen que codifica para la monoamino oxidasa A aunque disminuye la actividad de esta enzima (165), que cataliza la conversión de serotonina en melatonina. Cada vez son más las evidencias que conducen a asociar los polimorfismos del gen de la monoamino oxidasa A y la susceptibilidad para padecer la EA.

La melatonina es sintetizada por células de la retina y de la glándula pineal y regula los ritmos circadianos endógenos. Entre sus funciones se incluyen la acción neuromoduladora, la vasoactiva, la antioxidante y la neuroprotectora. Como sabemos, la melatonina y la luz regulan la liberación de DA en la retina y a través de este neurotransmisor se modula parte de la información que llega a las células ganglionares. También tiene un papel muy importante en el proceso de adaptación a la luz de los fotorreceptores y en la modulación de la información que reciben las células horizontales desde los fotorreceptores. Todas estas funciones de la DA están relacionadas con la elaboración, el contraste y el color de la información visual. Por otro lado, Sevaskan y col. (206) han encontrado que la expresión de los receptores de melatonina MT1 y MT2 disminuye en la retina de pacientes con EA. Esto nos hace pensar que la acción de la melatonina en la retina de estos pacientes estaría limitada por la reducción de la densidad de sus receptores y, en caso de que sucediera lo mismo que en la glándula pineal de personas con Alzheimer, por la disminución de la síntesis de melatonina. Esto influiría en la liberación y en la recaptura de DA, en la modulación de la información visual mediada por este neurotransmisor y, en definitiva, en los problemas visuales que padecen estas personas.

Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica y neurodegenerativa que se caracteriza por la desmielienización de los axones (pérdida de la mielina que envuelve los axones), por la formación de placas escleróticas y la atrofia del SNC. El proceso inflamatorio aparece en las etapas tempranas de la enfermedad y posteriormente se produce la pérdida de neuronas (207, 208). La inflamación es parte de la respuesta del sistema inmune desencadenada por autoanticuerpos generados contra moléculas propias y que las células del sistema inmune las reconoce como extrañas. Estudios histopatológicos han demostrado que la relación entre anticuerpos humorales y desmielinización existe en más del 50% de los caso de EM (209). Se han estudiado distintos autoanticuerpos contra diferentes antígenos de oligodendrocitos, de la mielina o de las neuronas, aunque la diana más estudiada es una glicoproteína de la vaina de mielina llamada MOG («myelin oligodendrocyte glycoprotein») (209). A pesar de que por el momento se desconoce porqué se genera la respuesta autoinmune, si se han propuesto gran cantidad de factores de riesgo que influirían en el desarrollo de esta patología, por ejemplo: infecciones, la genética del individuo ya que el 15% de los pacientes tiene algún familiar que padece EM o el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). De hecho, se tienen evidencias de que determinados alelos del MHC de clase II y los linfocitos T cooperadores (CD4+), así como, la MHC de clase I, los linfocitos T «asesinos» o CD8+ y el receptor de linfocitos T autorreactivos específicos de mielina están relacionados con la susceptibilidad de padecer esta enfermedad (210).

La pérdida de visión y de la agudeza visual son las disfunciones visuales más frecuentes que se producen en la EM (211). Estas alteraciones pueden detectarse en estudios electrofisilógicos, pues uno de los cambios más significativos, que además se correlaciona con la disminución de la agudeza visual, es la reducción de la latencia de los VEPs (211). También la utilización de otras técnicas no invasivas como la OCT («optical coherence tomogrphy») ha permitido demostrar que el grosor de la CFNO disminuye en pacientes con EM (212, 213), lo cual coincide con la pérdida de los axones de las células ganglionares (212) y con la reducción del volumen macular (214). El origen de estos problemas visuales es la inflamación del nervio óptico, las alteraciones en las aferencias visuales como consecuencia de la desmielinización del nervio óptico y las deficiencias en los movimientos oculares (211, 214). Pero, ¿por qué se pierden los axones de las células ganglionares si éstos no están mielinizados? La mayoría de los procesos fisiopatológicos de esta enfermedad se producen en la sustancia blanca de diferentes áreas de SNC y en los nervios craneales, por lo que es bastante probable que las alteraciones que se producen en el nervio óptico (par craneal II), principalmente su desmielinización, den lugar a cambios en la conductividad de los axones que se proyectan desde las células ganglionares y que forman el nervio óptico. Pero además hay que tener en cuenta que al perder la mielina en los axones disminuye la velocidad de transmisión del impulso nervioso e, incluso puede que se llegue a bloquear provocando la degeneración de los axones.

Por otro lado, se ha descrito que las células de Müller de la retina humana expresan la proteína específica de la mielina de oligodendrocitos (21) y la gli-

coproteína asociada a mielina (50). Si las células del sistema inmune producen autoanticuerpos contra proteínas de la vaina de mielina, ¿podrían reconocer como antígenos a las proteínas características de oligodendrocitos que expresan estas células gliales en su membrana? Además, la mielinización intrarretinal en humanos está asociada con determinadas patologías oculares como la miopía, ambliopía o el estrabismo (49), por lo que este tipo de enfermedades podría estar relacionado con la susceptibilidad para desarrollar la esclerosis múltiple.

Síndrome de Tourette

El Síndrome de Tourette (ST) es un trastorno neurosiquiátrico que se caracteriza por movimientos repetitivos, estereotipados e involuntarios, tartamudez y tics vocales (215). Los primeros síntomas aparecen generalmente entre los 7 y los 10 años. Aunque pueden manifestarse durante toda la vida, la mayoría de las personas que padecen este síndrome presentan los síntomas más severos en los primeros años de la adolescencia y van mejorando al finalizar esta etapa y posteriormente en la madurez.

La causa de esta enfermedad se desconoce pero las investigaciones indican que podrían existir defectos en las conexiones entre la corteza y los centros relacionados con el control de movimientos comportamentales como son los ganglios basales (216-218). Por otro lado, los primeros estudios genéticos realizados en gemelos y en personas de una misma familia sugieren una forma de herencia autosómica dominante. Sin embargo, otros estudios señalan que algunos tipos de deficiencias de la atención ligadas a la hiperactividad y el trastorno obsesivo podrían estar asociados con el ST (218).

En la fisiopatología del ST está implicado el sistema de neurotransmisión dopaminérgico, de hecho, se ha encontrado que los niveles de DAT son muy elevados en el estriado de pacientes con esta enfermedad (216). Una de las hipótesis más aceptadas en relación con las causas de la patología es que la liberación de DA es muy elevada y que la respuesta a este NT podría ser mayor que en situaciones normales, por ejemplo por una hipersensibilización de los receptores de DA en el estriado (219), pues cuando los pacientes son tratados con antisicóticos (219, 220) o con agentes bloqueantes de la síntesis de DA (221) desaparecen los síntomas.

Este síndrome está asociado con alteraciones del campo visual posiblemente por un procesamiento visual anómalo a nivel sensorial y perceptual, principalmente de la visión en colores. Por ello se piensa que el sistema de la retina también estaría alterado (222).

CONCLUSIONES

Las enfermedades neurodegenerativas más comunes, como el Parkinson, el Alzheimer o la enfermedad de Huntigton, no sólo afectan a centros corticales y subcorticales sino que también afectan a la retina. Quizá tengan menor relevancia, desde el punto de vista clínico, las alteraciones visuales respecto a otros síntomas como pueden ser la pérdida de memoria o las alteraciones motoras relacionas con la realización de tareas diarias, por ejemplo comer, andar, etc. Sin embargo, resulta muy interesante el hecho de poder detectar cambios patológicos en la retina a nivel electrofisiológico, pues las técnicas de diagnóstico oftalmológico: el electrorretinograma, la OCT («optical coherence tomogrphy») o el examen de fondo de ojo, podrían utilizarse como herramientas para determinar la evolución de algunas enfermedades neurodegenerativas. Además, la retina es una parte del SNC y desde el punto de vista experimental es fácilmente accesible por lo que podría ser un excelente modelo para estudiar la base molecular y genética de estas enfermedades, así como, una buena diana para la aplicación de nuevos fármacos y/o terapias en el tratamiento de éstas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Jacobson, M. (1993) Developmental neurobiology. Third Edition. Ed. Plenium Press. New York and London.
- (2) GILBERT, S. F. (1997) Developmental biology. Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. pp: 253-306.
- (3) Masland, R. H. (2001) Neuronal diversity in the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 431-436.
- (4) Barnstable, C.J. (1987) A molecular view of vertebrate retinal development. *Mol. Neurobiol.* 1: 9-46.
- (5) DE LA ROSA, E.J. Y DE PABLO, F. (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurothrophic theory. *Trends Neurosci.* 23: 454-458.
- (6) Zahng, S.S.; Fu, X.Y. y Barnstable, C.J. (2002) Molecular aspects of vertebrate retinal development. *Mol. Neurobiol.* 26: 137-52.
- (7) LA COURT, M. Y EHINGER, B. (2006) The retina. En: Advances in organ biology. The biology of the eye. (Fischbarg, J., Eds), volumen 10 pp: 195-252. Elsevier B. V. Inc.
- (8) Gallego, A. (1971) Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vis Res. Suppl.* 3: 33-50.

- (9) Нокоск, J.N.; Oliveira, M.M. y Ahnelt, P. (1993) Tree types of horizontal cells in a primitive mammal, the opossum (*Didelphis marsupialis aurita*): a golgi-LM study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 11-52.
- (10) LÖHRKE, S.; BRANDSTÄTTER, J.H.; BOYCOTT, B.B. Y PEICHL, L. (1995) Expression of neurofilament proteins by horizontal cells in the rabbit retina varies with retinal location. *J. Neurocytol.* 24: 283-300.
- (11) Lyser, K.M.; Li, A.I. y Núñez, M. (1994) Horizontal cells in the rabbit retina: different subtypes at neonatal and postnatal stages. *Int. J. Dev. Neurosci.* 12: 673-682.
- (12) SCHEIBE, R.; SCHNITZER, J.; RÖHRENBECK, J.; WOHLRAB, F. Y REICHENBACH, A. (1995) Development of A-type (axonless) horizontal cells in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 354: 438-458.
- (13) Dowling, J. E. (1987) The Retina: An Approchable part of the Brain. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusets and London.
- (14) Karten, H. J.; Fite, K. V. y Brecha, N. (1977) Specific projection of displaced ganglion cells upon accessory optic system in the pigeon (*Columbia libia*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 1753-1756.
- (15) Berson, D.M. (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci*. 26: 314-320.
- (16) Rollag, M.D.; Berson, D.M. y Provencio, I. (2003) Melanopsin, ganglion cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J. Biol. Rithms*. 18: 227-234.
- (17) Berson, D.M. (2007) Phototransduction in ganglion-cell in photoreceptors. *Eur. J. Physiol.* 454: 849-855.
- (18) Ramón y Cajal, S. (1889) Sur la morphologie et les connexions del éléments de la retine des oiseaux. *Anat. Anz.* 4: 111-121.
- (19) Reichenbach, A. (1987) Quantitative and qualitative morphology of rabbit retinal glia. A light microscopical study on cells both *in situ* and isolated by papaine. *J. Hirnforsch.* 28: 213-220.
- (20) PRADA, F.A.; QUESADA, A.; DORADO, M.E.; CHMIELEWSKI, C. Y PRADA, C. (1998) Glutamine synthetasa (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia*. 22: 1-16.
- (21) PRADA, F.A.; QUESADA, A.; AGUILERA, Y.; SANTANO, C. Y PRADA, C. (2001) The Müller cells express myelin oligodendrocyte specific protein (MOSP). *Ophthalmic Res.* 33: 237-250.
- (22) PÉREZ-ÁLVAREZ, M.J.; ISIEGAS, C.; SANTANO, C.; SALAZAR, J.J.; RAMÍREZ, A.I.; TRI-VIÑO, A.; RAMÍREZ, J.M.; ALBAR, J.P.; DE LA ROSA, E.J. y PRADA, C. (2008) Vimentin

- isoform expression in the human retina characterized with the monoclonal antibody 3CB2. *J. Neurosci. Res.* 86: 1871-1883.
- (23) REICHENBACH, A. Y ROBINSON, S.R. (1995) Ependymoglia and ependymoglia-like cells. En: Neuroglia. (Ketteman, H. y Ransom, B. eds.), Oxford University Press.
- (24) REICHENBACH, A.; GERMER, A.; BRINGMANN, A.; BIEDERMANN, B.; PANNICKE, T.; FRANCKE, M.; KUHRT, H.; REICHELY, W. Y MACK, A. (1998) Glio-neuronal interactions in the retinal development. En: Development and organization of the retina. From molecules to function. Ed: L.M. Chalupa and B.L. Finlay. 1ª edición. Plenum Press. New York, London. pp.: 121-146.
- (25) Newman, E.A. (2001) Glia of the retina. En: Retina. 3.ª edición. Volumen:1 Ed: Stephen J. Ryan. St. Louis, Mosby. pp.: 89-103.
- (26) Newman, E.A. (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 26: 536-542.
- (27) SARTHY, V. Y RIPPS, H. (2001) Neuron-glia signaling pathways. En: The retinal Müller cell. (Kluwer Academic/Plenum Publishers) Capítulo 4 pp: 101-133.
- (28) DE MELO, R.A.; VENTURA, A.; SCHITINE, C.S.; DE MELLO, M. Y DE MELLO, F. (2008) Müller glia as an active comparment modulating nervous activity in the vertebrate retina: neurotransmitters and trophic factors. *Neurochem. Res.* 33: 1466-1474.
- (29) Fischer, A.J. Y Reh, T.A. (2001) Müller glia are a potencial source of neural regeneration in the postnatal chick retina. *Nat. Neurosci.* 4: 247-252.
- (30) DYER, M.A. Y CRPKO, C.L. (2000) Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat. Neurosci.* 3: 873-880.
- (31) WOLTER, J.R. (1955) The cells of remak and the astroglia of the normal human retina. *Arch. Ophthalmol.* 53: 832-838.
- (32) Karschin, A. A.; Wässle, H. Y Schnitzer, J. (1986) Immunocytochemical studies on astroglia of the cat retina under normal and pathological conditions. *J. Comp. Neurol.* 249: 564-576.
- (33) SCHNITZER, J. (1987) Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Nerosci. Lett.* 78:29-34.
- (34) SCHNITZER, J. (1988) Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glia) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Dev. Brain Res.* 44: 59-72.
- (35) Stone, J. Y Dreher, Z. (1987) Relationship between astrocytes, ganglion cells and the vasculature of the retina. *J. Comp. Neurol.* 255: 35-49.

CONCEPCIÓN SANTANO SÁNCHEZ Y JESÚS PINTOR JUST

- (36) ROBINSON, S.R. Y DREHER, Z. (1990) Müller cells in adult rabbit retina: morphology, distribution and implications for functions and development. *J. Comp. Neurol.* 292: 178-192.
- (37) DISTLER, C.; WEIGEL, H. Y HOFFMANN, K.-P. (1993) Glial cells of the monkey retina. I. Astrocytes. *J. Comp. Neurol.* 333: 134-147.
- (38) TRIVIÑO, A.; RAMÍREZ, J.M.; RAMÍREZ, A.I.; SALAZAR, J.J. Y GARCÍA-SÁNCHEZ, J. (1997) Comparative study of astrocytes in human and rabbit retina. *Vision Res.* 37: 1707-1711.
- (39) DISTLER, C.; KOPATZ, K. Y TELKES, I. (2000) Developmental changes in astrocyte density in the macaque perifoveal region. *Eur. J. Neurosci.* 12: 1331-1341.
- (40) HADDAD, A.; RAMÍREZ, A.I.; LAICINE, E.M.; SALAZAR, J.J.; TRIVIÑO, A. Y RAMÍREZ, J.M. (2001) Immunohistochemistry in association with scanning electron microscopy for the morphological characterization and location of astrocytes of the rabbit retina. *J. Neurosci. Methods.* 106: 131-137.
- (41) RUNGGER-BRÄNDLE, E.; MESSERLI, J.M.; NIEMEYER, G. Y EPPENBERGER, J.M. (1993) Confocal microscopy and computer assited image reconstruction of astrocytes in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci.* 5: 1093-1106.
- (42) Stone, J.; Itin, A.; Alon, T.; Peter, J.; Gnessin, H.; Chan-Ling, T. y Keshet, E. (1995) Development of retinal vasculature is mediated by hipoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J. Neurosci.* 15: 4738-4747.
- (43) Berliner, M.L. (1931) Cytologic studies on the retina: I. Normal coexistence of oligodendroglia and myelinated nerve fibers. *Arch. Ophthalmol.* 6: 740-751.
- (44) LEGRAND, C.; FERRANZ, C.; CLAVEL, M.C. Y RABIÉ, A. (1991) Distribution of gelsolin in the retina of the developing rabbit. *Cell Tiss*, *Res*. 264: 335-338.
- (45) Robinson, S.R.; Hampson, E.C.G.M.; Munro, M.N. y Vaney, D.I. (1993) Undirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science*. 262: 1072-1074.
- (46) EHINGER, B.; ZUCKER, C.L.; BRUNN, A. Y ADOLPH, A. (1994) *In vivo* staining of oligodendroglia in the rabbit retina. *Glia*. 10: 40-48.
- (47) Morcos, Y. Y Chan-Ling, T. (2000) Concentration of astrocytic filaments at the retinal optic nerve junction is coincident with the absence of intra-retinal myelination: compartive and developmental evidence. *J. Neurocytol.* 29: 665-678.
- (48) Holland, P.M. Y Anderson, B. (1976) Myelinated nerve fibers and severe myopia. *Am J. Ophthalmol.* 81: 597-599.
- (49) STRAATSMA, B.R.; HECKENLIVELY, J.R.; Foss, R.Y. Y SHAHINIAN, J.K. (1979) Myelinated retinal nerve fibers associated with ipsilateral myopia, amblyopia and strabismus. *Am. J. Ophthalmol.* 88: 506-510.

- (50) STEFANSSON, K.; MOLNAR, M.L.; MARTON, L.S.; MOLNAR, G.K.; MIHOVILOVIC, M.; TRIPATHI, R.C. Y RICHMAN, D.P. (1984) Myelin-associated glycoprotein in the human retina. *Nature*. 307: 548-550.
- (51) Kodama, T.; Hasayaka, S. y Setogawa, T. (1990) Myelinated retinal nerve fibers: prevalence, location and effect on visual acuity. *Ophthalmologica*. 200: 77-83.
- (52) FITZGIBBON, T. Y NESTOROVSKY, Z. (1997) Morphological consequences of myelination in human retina. *Exp. Eye Res.* 65: 809-819.
- (53) Hunter, S.F.; Leavitt, J.A. y Rodríguez, M. (1997) Direct observation of the myelination *in vivo* in the mature human central nervous system. A model for the behavior of oligodendrocyte progenitors and their progeny. *Brain*. 120: 2071-2082.
- (54) PULIDO, J.E.; PULIDO, J.S.; ERIE, J.C.; ARROYO, J.; BERTRAM, K.; LU, M. Y SHIPPY, S. (2007) A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease. *Exp. Diabetes Res.* 2007: 1-7.
- (55) BEART, P.M. Y O'SHEA, R.D. (2007) Transporter for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Brithis J. Pharmacol.* 150: 5-17.
- (56) Brandies, R. y Yehuda, S. (2008) The possible role of retinal dopaminergic system in visual performance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32: 611-656.
- (57) JOHNSON, J.; TIAN, N.; CAYWOOD, M.S.; REINER, R.J.; EDWARDS, R.H. Y COPENHAGEN, D.R. (2003) Vesicular neurotransmitter transporter expresión in developing postnatal rodent retina: GABA y glycine preced glutamate. *J. Neurosci.* 23: 518-529.
- (58) Shen, Y.; Liu, X. y Yang, X. (2006) N-methyl-D-aspartato receptors in the retina. *Mol. Neurobiol.* 34: 163-179.
- (59) Marc, R.E. (2004) Retinal neurotransmitters. http://prometheus.med.utah.edu/~marclab/pubx_pdf_2004_marc_retinal%20_NTs-pdf.
- (60) Puro, D.G.; Yuan, J.P. y Sucher, N.J. (1996) Activation of NMDA receptor-channels in human retinal Müller glial cells inhibits inward-rectifying potassium currents. *Vis. Neurosci.* 13: 319-326.
- (61) ARRIZA, P.M.; ELIASOF, S.; KAVANANG, M.P. Y AMARA, S.G. (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 4155-4160.
- (62) Newmann, E.A. (2004) Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia*. 47: 268-274.
- (63) Wolosker, H.; Blackshaw, S. y Snyder, S.H. (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:13409-13414.

- (64) Mothet, J.P.; Parent, A.T.; Woloster, H.; Brady, R.O.; Linden, D.J.; Ferris, C.D.; Rogavoski, M.A. y Snyder, S.H. (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 4926-4931.
- (65) STEVENS, E.R.; ESQUERRA, M.; KIM, P.; NEWMANN, E.A.; SNYDER, S.H.; ZAHS, K.R. Y MILLER, R.F. (2003). D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the functional expression of NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 6789-6794.
- (66) Kielczewski, J.L.; Pease, M.E. y Quigley, H.A. (2005) The effect of experimental glaucoma and optic nerve transection in amacrine cells in the rat retina. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* 46: 3188-3196.
- (67) MACNEIL, M.A. Y MASLAND, R.H. (1998) Extreme diversity amacrine cells: implications for function. *Neuron*. 20: 971-982.
- (68) Masland, R.H. (2005) The many roles of *starburst* amacrine cells. *Trends Neurosci*. 28: 395-396.
- (69) SCHMIDT, M. (2008) GABA (C) receptors in retina and brain. *Results Probl. Cell Differ*. 44: 49-67.
- (70) Wässle, H.; Koulen, P.; Brandstätter, J.H.; Fletcher, E.L. y Becker, C. (1998) Glycine y GABA receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* 38: 1411-1430.
- (71) Shen, W. y Jiang, Z. (2007) Characterization of glicinergic synapses in vertebrate retina. *J. Biomedical Sci.* 14: 5-13.
- (72) Newmann, E.A. (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J. Neurosci.* 23: 1659-1666.
- (73) Witkovsky, P. (2004) Dopamine and retinal function. *Documenta Ophthalmologica*. 108: 17-40.
- (74) MORIN, L.P. Y ALLEN, C.N. (2006) The circadian visual system, 2005. *Brain Res. Reviews*. 51: 1-60.
- (75) Vugler, A.A.; Redgrave, P.; Semo, M.; Lawrence, J.; Greenwood, J. y Coffey, P.J. (2007) Dopamine neurones form a discrete plexus with melanopsin cells in normal and degenerating retina. *Exp. Neurolgy*. 205: 26-35.
- (76) Nir, J.; Haquee, R. E y Iuvone, P.M. (2000) Diurnal metabolism of dopamine in dystrophic retinas of homozygous and heterozygous retinal degeneration slow (rds) mice. *Brain Res.* 884: 13-22.
- (77) Tosini, G. y Menaker, M. (1998) The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res*. 789: 221-228.

- (78) Wiechmann, A.F. y Summers, J.A. (2008) Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues. *Progress Retinal Eye Res.* 27: 137-160.
- (79) Brandies, R. y Yehuda, S. (2008) The possible role of retinal dopaminergic system in visual performance. *Neurosci. Biobehavioral Rev.* 32: 611-656.
- (80) Dong, W.; Sun, W.; Zhang, Y.; Chen, X. y He, S. (2004) Dendritic relationship between *starburst* amacrine cells and direction-selective ganglion cells in the rabbit retina. *J. Phisiol.* 556: 11-17.
- (81) Zhang, M.; Budak, M.T.; Lu, W.; Khurana, T.S.; Zhang, M.; Laties, A.M. y Mitchell, C. H. (2006) Identification of the A3 adenosine receptor in rat retinal ganglion cells. *Mol. Vis.* 12: 937-948.
- (82) Zhang, X.; Zhang, M.; Laties, A.M. y Mitchell, C. H. (2006) Balance of purines may determine life or death of retinal ganglion cells as A3 adenosine receptors prevent loss following P2X7 receptor stimulation. *J. Neurochem.* 98: 566-575.
- (83) Crooke, A.; Guzmán-Aránguez, A.; Peral, A.; Abburrahman, M.K.A. y Pintor, J. (2008) Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. *Pharmacol. Therapeutics*. 119: 55-73.
- (84) YAZULLA, S. Y STUDHOLME, K.M. (2004) Vanilloid receptor like 1 (VRL1) immunoreactivity in mammalian retina: colocalization with somatostatin and purinergic P2X1 receptor. *J. Comp. Neurol.* 474: 407-418.
- (85) Greenwood, D.; Yao, W.P. y Housley, G.D. (1997) Expression of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the retina. *Neuroreport*. 8: 1083-1088.
- (86) WHEELER-SCHILLING, T.H.; MARQUORDT, K.; KOHLER, K.; GUENTHER, E. Y JABS, R. (2001) Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 92: 177-180.
- (87) PUTHUSSERY, T. Y FLETCHER, F.I. (2007) Neuronal expression of P2X3 purinoceptors in the rat retina. *Neurosc.* 146: 403-414.
- (88) SHIGEMATSU, Y., SHIMODE, Y. Y KANEDA, M. (2007) Distribution of immunoreactivity for P2X3, P2X5 and P2X6-purinoceptors in mouse retina. *J. Mol. Hist.* 38: 369-371.
- (89) Brändle, U.; Kohler, K. y Wheeler-Schilling, T.H. (1998) Expression of the P2X7 receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 62: 106-109.
- (90) Puthussery, T. y Fletcher, F.I. (2004) Synaptic localization of P2X7 receptors in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 472: 13-23.

- (91) FRIES, J.E.; WHEELER-SCHILLING, T.H.; GUENTHER, E. Y KOHLER, K. (2004) Expression of P2Y1, P2Y2, P2Y4 and P2Y6 receptor subtypes in the rat retina. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* 45: 3410-3417.
- (92) PINTOR, J.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; IRAZU, M.; MEDIERO, A.; PELÁEZ, T. Y PERAL, A. (2004) Immunolocalization of P2Y receptors in the rat eye. *Purinergic signalling*. 1: 83-90.
- (93) COWLEN, M.S.; ZHANG, V.Z.; WARNOCK, L.; MOYER, C.F.; PETERSON, W.M. Y YERXA, B.R. (2003) Localization of ocular P2Y2 receptor gene expression by *in situ* hybridation. *Exp. Eye Res.* 77: 77-84.
- (94) FRIES, J.E.; GOCZALIK, I.M.; WHEELER-SCHILLING, T.H.; KOHLER, K.; GUENTHER, E.; WOLF, S.; WIEDEMANN, P.; BRINGMANN, A.; REICHENBACH, A.; FRANCKE, M. Y PANNICKE, T. (2005) Identification of P2Y receptor subtypes in human Müller glial cells by physiology single cell RT-PCR and immunohistochemistry. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* 46: 3000-3007.
- (95) Jabs, R.; Guenther, E. y Marquordt, K. (2000) Evidence for P2X3, P2X4, P2X5 but not P2X7 containing purinergic receptors in Müller cells of the retina. *Mol. Brain Res.* 76: 205-210.
- (96) PANNICKE, T.; WOLFGANG, F.; BIEDERMANN, B.; SCHÄDLICH, H.; GROSCHE, J.; FANDE, F.; WIEDEMANN, P.; ALGAIER, C.; ILLES, P.; BURNSTOCK, G. Y REICHENBACH, A. (2000) P2X7 receptors in Müller glial cells from human retina. *J. Neurosc.* 20: 5965-5972.
- (97) NEAL, M. Y CUNNINGHAM, J. (1994) Modulation by endogenous ATP of the light evoked release of ACh from retinal cholinergic neurones. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1085-1087.
- (98) Cowen, T. (2000) Selective vulnerability in adult and aging mammalian neurons. *Autonomic Neuroscience: Basic and clinical.* 96: 20-24.
- (99) MIGLIORE, L. Y COPPEDÈ, F. (2002) Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutation Research*. 1-19.
- (100) DAUER, W. Y PERZEDBORSKI, S. (2003) Parkinson's disease mechanism and models. *Neuron*. 39: 889-909.
- (101) Perzedborski, S.; Jackson-Lewis, I.; Djaldetti, R.; Liberatore, G.; Vila, M.; Vukosavic, S. y Almer, G. (2000) The parkinsoniam toxin MPTP: action and mechanism. *Restorative Neurol. Neurosci.* 16: 135-142.
- (102) Harnois, C. y Di Paolo, T. (1990) Decreased dopamine in the retinas of patients with Parkinson's disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31: 2473-2475.
- (103) Nagatsu, T. y Sawada, M. (2007) Biochemistry of *postmortem* brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. *J. Neural Trasm. Suppl.* 72: 113-120.

- (104) Marsden, C.D. (1983) Neuromelanin and Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 19: 121-141.
- (105) PARKER, W.D.; BOYSON, S.J. Y PARKS, J.K. (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Annl. Neurol.* 26: 719-723.
- (106) Bodis-Wollner, I. (2003) Neuropsychological and perceptual defects in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Releated Disorders*. 9: 583-589.
- (107) Frederick, J.M.; Rayborn, M.E.; Laties, A.M.; Lam, D.M.K. y Holyfield, J.G. (1982) Dopaminergic neurons in the human retina. *J. Comp. Neurol.* 210: 65-79.
- (108) Masson, G.; Mestre, D. y Blin, O. (1993) Dopaminergic modulation of visual sensitivity in man. *Fundaments of Clinical Pharmacology*. 7: 449-463.
- (109) INZELBERG, R.; RAMÍREZ, J.A.; NISEPEANU, P. Y OPHIR, A. (2004) Retinal nerve fiber layer thinning in Parkinson's disease. *Vision Res.* 44: 2793-2797.
- (110) Bodis-Wollner, I. y Tagliati, M. (1993) The visual system in Parkinson's disease. *Advaces in Neurology*. 60: 390-394.
- (111) Wong, C.G.; Ishibashi, T.; Tucker, G. y Hamasaki, D. (1985) Responses of the pigmented rabbit retina to MPTP, a chemical inducer of parkinsonism. *Exp. Eye Res.* 40: 509-519.
- (112) MARIANI, A.P.; NEFF, N.H. Y HADJICONSTANTINOU, M. (1986) 1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahidroxipiridine (MPTP) treatment decreases dopamine and increase lipofuscin in mouse retina. *Neurosci. Lett.* 72: 221-226.
- (113) Adams, J.D.; Pickford, M.S. y Wong, C.G. (1992) The acute retinal histopathology of MPTP. *Neurotoxicology*. 13: 541-549.
- (114) Chen, S.T.; Hsu, J.R.; Hsu, P.C. Y Chuang, J.I. (2003) The retina as a novel *in vivo* model for studying the role of molecules of the Bcl-2 family in relation to MPTP neurotoxicity. *Neurochemical Research*. 28: 805-814.
- (115) CUENCA N.; HERRERO, M.T.; ANGULO, A.; DE JUAN, E.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, G.C.; LÓPEZ, S.; BARCIAA, C. Y MARTÍN-NIETO, J. (2005) Morphological impairments in retinal neurons of the scotopic visual pathway in a monkey model of Parkinson's disease. *J. Comp. Neurol.* 493: 261-273.
- (116) BIEHLMAIER, O.; ALAM, M. Y SCHMIDT, W. (2007) A rat model of parkinsonism shows depletion of dopamine in the retina. *Neurochemistry International*. 50: 189-195.
- (117) Zhang, C.; Rojas, J.C. y González-Lima, F. (2006) Methylene blue prevents neurodegeneration caused by rotenone in the retina. *Neurotox. Res.* 9: 47-57.
- (118) Zhang, X.; Jones, D. y González-Lima, F. (2006) Neurodegeneration produced by rotenone in the mouse retina: a potential model to investigate environmental

CONCEPCIÓN SANTANO SÁNCHEZ Y JESÚS PINTOR JUST

- pesticide contributions to neurodegenerative diseases. J. Toxicol. Environ. Health A. 69: 1681-1697.
- (119) TATTON, W.G.; KWAN, M.M.; VERRIER, M.C.; SENIUK, N.A. Y THERIAULT, E. (1990) MPTP produce reversible disappearance of tyrosine hidrolase-containing retinal amacrine cells. *Brain Res.* 527: 21-31.
- (120) VANDER-HEIDEN, M.G. Y THOMPSON, C.B. (1999) Bcl-2 protein: regulators apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biol.* 1: 209-216.
- (121) Chuang, J.I.; Chen, S.T.; Chang, Y.H. y Jen, L.S. (2001) Alteration of Bcl-2 expression in the nigrostriatal system following kainite injection. *J. Chem. Neuroanat.* 21: 2115-2123.
- (122) Mogi, M.; Harada, M.; Kondo, T.; Mizumo, Y.; Narabayshi, H.; Riederer, P. y Nagatsu, T. (1996) Bcl-2 protein is increased in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 215: 137-139.
- (123) HARTMANN, A.; MICHEL, P.P.; TROADEC, J.D.; MOVATT-PRIGENT, A.; FAUCHEUX, B.A.; RUBERG, M.; AGID, Y HIRSCH, E.C. (2001) Is bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *J. Neurochem.* 76: 1785-1793.
- (124) CALZETTI, S.; FRANCHI, A.; TARATUFOLO, G. Y GROPPI, E. (1990) Simultaneous VEP and PERG investigations in early Parkinson's disease. *J. Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 53: 114-117.
- (125) GUILARDI, M.P.; MARX, M.S.; BODIS-WOLLNER, I.; CAMRAS, C.B. Y GLOVER, A.A. (1989) The effect of intraocular 6-hidroxidopamine in retinal processing of primates. *Annl. Neurology*. 25: 357-364.
- (126) Zogbbi, H.Y. y Orr, H.T. (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 23: 217-247.
- (127) ABOU-SLEYMANE, G.; CHAMEL, F.; HELMLINGER, D.; LADERNOIS, A.; THIBAULT, C.; WEBER, C.; MERIENNE, K.; MANDEL, I.; POUR, D.; DEVYS, D. Y TROTTIER, V. (2006) Polyglutamine expansion cases neurodegeneration by altering the neuronal differentiation program. *Human Mol. Genetics*. 15: 691-703.
- (128) Ross, C.A. (2002) Polyglutamine pathogenesis emergence of unifying mechanism for Huntington's disease and releated disorders. *Neuron*. 35: 819-822.
- (129) Sugars, K.L. y Rubinsztein, D.C. (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington's disease. *Trends Neurosci*. 19: 233-238.
- (130) Landles, C. Y Bates, G.P. (2004) Huntington and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 5: 958-963.

- (131) PALHAN, V.B.; CHEN, S.; PENG, G.H.; TJEMBERG, A.; GAMPER, A.M.; FAN, Y.; CHAIT, B.T.; LA SPADA, A.R. Y ROEDER, R.G. (2005) Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 8472-8477.
- (132) MacMahon, S.J.; Pray-Grant, M.G.; Schieltz, D.; Yates, J.R. y Grant, P.A. (2005) Polyglutamine-expanded spinocerebellar ataxia-7 protein disrupts normal SAGA and SLIK histone acetyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102: 8478-8482.
- (133) Fusco, F.R.; Chen, Q.; Lamoreaux, W.J.; Figueredo-Cárdenas, G.; Jiao, Y.; Coffman, J.A.; Surmmier, A.J.; Honning, M.G.; Carlock, L.R. y Reiner, A. (1999) Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *J. Neurosc.*, 19: 1189-1202.
- (134) RAMASWAMY, S.; McBride, J.L. y Kordower, J.H. (2007) Animal models of Huntington's disease. *ILAR Journal*. 48: 356-373.
- (135) Caviston, J.P.; Ross, J.L.; Antony, S.M.; Tokito, M. y Holzbaur, E. (2007) Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 10045-10050.
- (136) Strehlow, A.N.T.; Li, J.Z. y Myers, R.M. (2007) Wild-type huntingtin participates in protein trafficking between the golgi and the extracellular space. *Human Mol. Genetics*. 16: 391-409.
- (137) Zhangs, H.; Das, S.; Li, Q.Z.; Dragatsis, I;, Repa, J.; Zeitlin, S.; Hajnóczky, G. y Bezprozvanny, I. (2008) Elucidating a normal function of huntingtin by functional and mycroarray analysis of huntingtin-null mouse embryonic fibroblasts. BMC Neurosci. 9: 1-15.
- (138) GERVAIS, F.G.; SINGARAJA, R.; XANTHOUDAKIS, S.; GUTEKUNST, C.A.; LEAVITT, B.R.; METZLER, M.; HACKMAN, A.S.; TAM, J.; VAILLANCOURT, M.R.; HOUTZAGER, V.; RASPER, D.M.; ROY, S.; HAYDEN, M.R. Y NICHOLSON, D.W. (2002) Recruitment and activation of caspase-8 by the huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat. Cell Biol.* 4: 95-105.
- (139) RIGAMONTI, D.; BAUER, J.H.; DE FRAJA, C.; CONTI, L.; SIPIONE S.; SCIORATI, C.; CLEMENTI, E.; HACKAM, A.; HAYDEN, M.R.; LI, Y.; COOPER, J.R.; ROSS, C.A., GOVONI, S.; VICENZ, C. Y CATTANEO, E. (2000) Wild-type huntingtin protecs from apoptosis upstream of caspase-3. *J. Neurosci.* 20: 3705-3713.
- (140) Petersen, A.; Mani, K. y Brundin, P. (1999) Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 157: 1-18.
- (141) REDDY, P.H.; WILLIAMS, M. Y TAGLE, D.A. (1999) Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Neurosci.* 22: 248-255.

- (142) Luthi-Carter, R.; Hanson, S. A.; Strand, A. D.; Bergstrom, D. A.; Chun, W.; Peters, N. L.; Woods, A. M.; Chan, E. Y.; Kooperberg, C.; Krainc, D.; Young, A.B.; Tapscott, S.J. y Olson, J.M. (2002) Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Human Mol. Genetics.* 11: 1911-1926.
- (143) MacDonald, V. y Holliday, G. (2002) Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 10: 378-386.
- (144) PAULUS, W.; ACHWARZ, G.; WERNER, A.; LANGE, H.; BAYER, A.; HOFSCHUSTER, M.; MÜLLER, N. Y ZRENNER, E. (1993) Impairment of retinal increment thresholds in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* 34: 574-578.
- (145) Petrasch-Parwez, L.; Sathasivam, K.; Seller, M.; Cozeus, B.; Harper, A.; Hetherington, C.; Lawton, M.; Trottier, Y.; Lehrach, H.; Davies, S.W. y Bates, G.P. (2005) Is the retina affected in Huntington's disease? *Acta Neuropathol*. 110: 523-525.
- (146) HELMLINGER, D.; YVERT, G.; PICAUD, S.; MERIENNE, K.; SAHEL, J.; MANDEL, J. Y DEVYS, D. (2002) Progressive retinal degeneration and dysfunction in R6 Huntington's disease mice. *Human Mol. Genetics*. 11: 3351-3359.
- (147) HELMLINGER, D.; ABOU-SLEYMANE, G.; YVERT, G.; ROUSSEAU, S.; WEBER, C.; TROTTIER, Y.; MANDEL, J.L. y DEVYS, D. (2004) Disease progression despite early loss of polyglutamine protein expression in SCA7 mouse model. *J. Neurosci.* 24: 1881-1887.
- (148) ZUCATTO, C.; TARTARI, M.; CROTTI, A.; GOLFREDO, D.; VALENZA, M.; CONTI, L.; CATAUDELLA, T.; LEAVITT, B.F.; HAYDEN, M.R.; LANDLES, C. Y BATES, G.P. (2004) Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO Reports*. 5: 958-963.
- (149) Young, R.W. (1985) Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain Res.* 353: 229-239.
- (150) Martins, R. y Pearson, R.A. (2008) Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* 1192: 37-60.
- (151) LIVESEY, F.J.; FURUKAWA, T.; STEFFEN, M.A.; CHURCH, G.M. Y CEPKO, C.L. (2000) Microarray analysis of the transcriptional network controlled by the photoreceptor homeobox gene Crx. *Current Biology*. 10: 301-310.
- (152) Borovecki, F.; Lovrecic, L.; Zhou, J.; Jeong, H.; Then, F.; Rosas, H.D.; Hersch, S.M.; Hogarth, P.; Bonzou, B.; Jensen, R.V. y Krainc, D. (2005) Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 11023-11028.
- (153) David, G.; Abbas, N.; Stevanin, G.; Durr, A.; Ivert, G.; Cancel, G. Y.; Weber, C.; Imbert, G.; Saudou, F.; Antoniou, E.; Drabkin, H.; Gemmill, R.; Giunti, P.;

- BENOMAR, A.; WOOD, N.; RUBREG, M.; AGID, Y.; MANDEL, J.L. Y BRICE, A. (1994) Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nature Genetics*. 17: 65-70.
- (154) HELMLINGER, D.; HARDY, S.; ABOU-SLEYMANE, G.; EBERLIN, A.; BOWMAN, A.B.; GANSMÜLLER, A.; PICAUD, S.; ZOGHBI, H.Y.; TROTTIER, Y.; TORA, L. Y DEVYS, D. (2006) Glutamine-expanded ataxin-7 alters TFTC/STAGA recruitment and chromatin structure leading to photoreceptor dysfunction. *PLOS Biology*. 4: 432-445.
- (155) HELMLINGER, D.; HARDY, S.; SASORITH, S.; KLEIN, F.; ROBERT, F.; WEBER, C.; MIGUET, L.; POTIER, N.; VAN-DORSSELAER, A.; WURTZ, J.M.; MANDEL, J.L; TORA, L. Y DEVYS, D. (2004) Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Human Mol. Genetics*. 13: 1257-1265.
- (156) JOHANSSON, J.; FORSGREN, L.; SANDGREN, O.; BRICE, A.; HOLMGREN, G. Y HOLMBERG, M. (1998) Expanded CAG repeats in Swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation. *Human Mol. Genetics*. 7: 171-176.
- (157) VAN DE WARRENBURG, B.P.; FRENKEN, C.W.; AUSEMS, M.G.; KLEEFSTRA, T.; SINKE, R.J.; KNOERS, N.V. Y DREMER, H.P. (2001) Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: the infantile phenotype. *J. Neurol.* 248: 911-914.
- (158) Bowman, A.B.; Yoo, S.; Dantuma, N.P. y Zoghbi, H.Y. (2005) Neuronal disfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with degree of nuclear inclusion formation. *Human Mol. Genetics*. 14: 679-691.
- (159) Martin, J.J.; Van Regemorter, N.; Krols, L.; Brucher, J.M.; De Barsy, T.; Szliwowski, H.; Evrard, P. y col. (1994) On an autosomal dominant form of retinal-cerebellar degeneration: an autopsy study of five patients in one family. *Acta Neurophol.* 88: 277-286.
- (160) IVERT, G.; LINDERBERG, K.S.; PICAUD, S.; LANDWEHRMEYER, G.B.; SAHEL, J. Y MANDEL, J. (2000) Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and transneuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Human Mol. Genetics.* 9: 2491-2506.
- (161) Merienne, K.; Friedman, J.; Akimoto, M.; Abou-Sleymane, G.; Weber, C.; Swaroop, A. y Trottier, Y. (2007) Preventing polyglutamine-induced activation of c-jun delays neuronal dysfunction in a model of SCA7 retinopathy. *Neurobiol. Dis.* 25: 571-581.
- (162) JINDONG DING, J.; LIN, L.; MACE, E.B.; HERRMANN, R.; SULLIVAN, P. Y RICKMAN, C.B. (2008) Targeting age-related macular degeneration with Alzheimer's disease based immunotherapies: anti-amyloid- antibody attenuates pathologies in an age-related macular degeneration mouse model. Vision Res. 48: 339-345

- (163) Mahley, RW. (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 240: 622-30.
- (164) TAKEHASHI, M.; TANAKA, S.; MASLIAH, E. Y UEDA, K. (2002) Association of monoamine oxidase A gene polymorphism with Alzheimer's disease and Lewy body variant. *Neurosci Lett.* 327: 79-82.
- (165) Tanzi, R.E. y Bertram, L. (2005) Twenty years of Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell.* 120: 545-555.
- (166) Zheng, H.; Jiang, M.; Trumbauer, M.; Sirinathsinghji, D.J.S.; Hopkins, R.; Smith, D.W.; Heavens, R.P.; Dawson, G.R.; Boyce, S.; Conner, M.W.; Stevens, K.A.; Slunt, H.H.; Sisodia, S.S.; Chen, H.Y. y Van der Ploeg, L.H.T. (1995). β-amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*. 81: 525-531.
- (167) Sabo, S.L.; Ikin, A.F.; Buxbaum, J.D. y Greengard, P. (2003) The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci*. 23: 5407-5415.
- (168) PÉREZ, RG.; ZHENG, H.; VAN DER PLOEG, L.H.T. Y KOO, E.H. (1997) The β-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J. Neurosci.* 17: 9497-9414.
- (169) Yamazaki, T.; Koo, E.H. y Selkoe, D.J. (1997) Cell surface β-amyloid protein precursor colocalizes with integrins 1 at substrate contact sites in neural cells. *J. Neurosci.* 17: 1004-1010.
- (170) Coulson, E.J.; Paliga, K.; Beyreuther, K. y Masters, C.L. (2000) What the evolution of the amyloid precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem. Int.* 36: 175-184.
- (171) KAMAL, A.; STOKIN, G.B.; YANG, Z.; XIA, C.H. Y GOLDSTEIN, L.S. (2000) Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron*. 28: 449-459.
- (172) Kamal, A.; Almenar-Queralt, A.; Leblanc, J.F.; Roberts, E.A. y Goldstein, L.S.B. (2001) Kinesin- mediated axonal transport of a membrane compartment containing β-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature*. 414:643-648.
- (173) Ohsawa, I.; Takamura, C.; Morimoto, T.; Ishiguro, M. y Kohsaka, S. (1999) Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur. J. Neurosci.* 11: 1907-1913.
- (174) CAILLE, I.; ALLINQUANT, B.; DUPONT, E.; BOUILLOT, C.; LANGER, A.; MÜLLER, U. Y PROCHIANTZ, A. (2004) Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development*. 131: 2173-2181.

- (175) SCHUBERT, W.; PRIOR, R.; WEIDEMANN, A.; DIRCKSEN, H.; MULTHAUPT, G.; MASTERS, C.L. Y BEYREUTHER, K. (1991) Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res.* 563: 184-194.
- (176) Moya, K.L.; Benowitz, L.I.; Schneider, G.E. y Allinquant, B. (1994) The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev. Biol.* 161: 597-603.
- (177) MORIMOTO, T.; OHSAWA, I.; TAKAMURA, C.; ISHIGURO, M. Y KOHSAKA, S. (1998) Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 51: 185-195.
- (178) KIRAZOV, E.; KIRAZOV, L.; BIGL, V. Y SCHLIEBS, R. (2001) Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo. Intern. *J. Dev. Neurosci.* 19: 287-296.
- (179) KAMENETZ, F.; TOMITA, T.; HSIEH, H.; SEABROOK, G.; BORCHELT, D.; IWATSUBO, T.; SISODIA, S.S. Y MALINOW, R. (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron*. 37: 925-937.
- (180) WANG, P.; YANG, G.; MOSIER, D.R.; CANG, P.; ZAIDI, T.; GONG, Y.D.; ZHAO, N.M.; DOMINGUEZ, B.; LEE, K.F.; GAN, W.B. Y ZHENG, H. (2005) Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. *J. Neurosci.* 25: 1219-1225.
- (181) Yang, G.; Gong, Y.-D.; Gong, K.; Jiang, W.-L.; Kwon, E.; Wang, P.; Zheng, H.; Zhang, X.-F.; Gan, W.-B. y Zhao, N. M. (2005) Reduced synaptic vesicle density and active zone size in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. *Neurosci. Lett.* 384: 66-71.
- (182) CAO, X. Y sSDHOF, T.C. (2001) A transcriptively active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*. 293: 115-120.
- (183) DE STOOPER, B. Y ANNAERT, W. (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* 113: 1857-1870.
- (184) LOFFLER, K. U.; EDWARD, D. P. Y Tso, M. O. (1995) Immunoreactivity against tau, amyloid precursor protein, and beta-amyloid in the human retina. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* 36: 24-31.
- (185) Jackson, G.R. y Owsley, C. (2003) Visual dysfunction, neurodegenerative diseases and aging. *Neurologic. Clinics*. 21: 709-728.
- (186) Dentchev, T.; Milam, A.H.; Lee, V.; Trojanowski, J.Q. y Dunai0el, J.L. (2003) Amyloid-β, is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas. *Mol. Vision.* 9: 184-190.

- (187) McKinnon, S. J. (2000) Paper at the Subspecialty Day Glaucoma. American Academy of Ophthalmology, Dallas, Texas.
- (188) Steriade, M. y Biesold, D. (1990) Brain cholinergic systems. (Steriade, M y Biesold, D., Eds). New Cork: Oxford University Press.
- (189) Fibiger, H.C. (1991) Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci*. 14: 220-223.
- (190) Mesulam, M.M. (1995) Structure and function of cholinergic pathways in the cerebral cortex, limbic system, basal ganglia and thalamus of the human brain. En: Psychopharmacology: the fourth generations of progress. (Bloom, E.E. y Kupfer, D.J., Eds). (pp.: 135-146). New York: Raven Press.
- (191) REINER, P.B. Y FIBIGER, H.C. (1995) Functional heterogeneity of central cholinergic systems. En: Psychopharmacology: the fourth generations of progress. (Bloom, E.E. y Kupfer, D.J., Eds). (pp: 147-153). New York: Raven Press.
- (192) Dajmgoz, M.B.A.; Hankins, M.W.; Hirano, J. y Archer, S.N. (1997) Neurobiology of retinal dopamine in relation to degenerative states of the tissues. *Vis. Res.* 37: 3509-3529.
- (193) HINTON, D.R.; SADUM, A.A.; BLANKS, J.C. Y MILLER, C.A. (1986) Optic nerve degeneration in Alzheimer's disease. *N. Eng. J. Med.* 315: 485-487.
- (194) BLANKS, J. C.; TORIGOE, Y.; HINTON, D.R. Y BLANKS, R.H.I. (1996) Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina. *Neurobiology Aging*. 17: 377-384.
- (195) PAQUET, C.; BOISSONNOT, M.; ROGER, F.; DIGHIERO, P.; GIL, R. Y HUGON, J. (2007) Abnormal retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters*. 420: 97-99.
- (196) Katz, B.; Rimmer, S.; Iragui, V. y Katzman, R. (1989) Abnormal pattern electroretinograms in Alzheimer's disease: evidence for retinal ganglion cell degeneration? *Ann. Neurol.* 26: 221-225.
- (197) TRICK, G.L.; BARRIS, M.C. Y MICKLER-BLUTH, M. (1989) Abnormal patterns electroretinograms in patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 26:226-231.
- (198) Mendez, M.F.; Mendez, M.A.; Martin, R.; Smyth, K.A. y Whitehouse, P.J. (1990). Complex visual disturbances in Alzheimer's disease. *Neurology*. 40: 439-443.
- (199) LEVINE, D.N.; LEE, J.M. Y FISHER, C.M. (1993) The visual variant of Alzheimer's disease: a clinico-pathologic case study. *Neurology*. 43: 305-313.

- (200) SKENE, D.J.; VIVIEN-ROELS, B. Y SPARKS, D.L. (1990) Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. *Brain Res.* 528: 170-174.
- (201) UCHIDA, K.; Окамото, N. Y OHARA, K. (1996) Daily rhythm of serum melatonin in patients with dementia of the degenerate type. *Brain Res.* 717: 154-159.
- (202) Moe, K.E.; Vitiello, M.V. y Larsen, L.H. (1995) Symposium: Cognitive processes and sleep disturbances: sleep/wake patterns in Alzheimer's disease: relationships with cognition and function. *J. Sleep Res.* 4: 15-20.
- (203) Pardo, C.A.; Martin, L.J. y Troncoso, J.C. (1990) The human pineal gland in aging and Alzheimer's disease: patterns of cytoskeletal antigen immunoreactivity. *Acta Neuropathol (Berl)*. 80: 535-540.
- (204) ARIETI, S. (1954) The pineal gland in old age. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 13: 482-491.
- (205) SAVASKAN, E.; JOCKERS, R.; AYOUB, M.; ANGELONI, D.; FRASCHINI, F.; FLAMMER, J.; ECKERT, A.; MÜLLER-SPAHA, F. Y MEYER, P. (2007) The MT2 melatonin receptor subtype is present in human retina and decreases in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 4: 47-51.
- (206) BITSCH, A.; SCHUCHARDT, J.; BUNKOWSKI, S.; KUHLMANN, T. Y BRUCK, W. (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*. 123: 117483.
- (207) BJARTMAR, C. Y TRAPP, B.D. (2001) Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr. Opin. Neurol.* 14: 2718.
- (208) Lalive, P. (2008) Autoantibodies in inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Swiss Med. Wkly*. En prensa.
- (209) FRIESE, M.A.; JALOBSEN, K.B.; FRIIS, L.; ETZENSPERGER, R.; CRANER, M.J.; McMa-HON, R.M.; JENSEN, L.T.; HUYGELEN, V.; JONES, E.Y.; BELL, J.I. y FUGGER, L. (2008) Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Nat. Med.* En prensa.
- (210) Mowry, E.M.; Balcer, L.J. y Galetta, S.L. (2007) Multiple sclerosis and the ophthalmologist. *Comprehensive Ophthalmology Update*. 8: 39-49.
- (211) Pueyo, V.; Martin, J.; Fernández, J.; Almarcegui, C.; Ara, J.; Egea, C.; Pablo, L. y Honrubia, F. (2008) Axonal loss in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 14: 609-614.
- (212) HENDERSON, A.P.; TRIP, S.A.; SCHLOTTMANN, P.G.; ALTMANN, D.R.; GARWAY-HEATH, D.F.; PLANT, G.T. y MILLER, D.H. (2008) An investigation of the retinal ner-

CONCEPCIÓN SANTANO SÁNCHEZ Y JESÚS PINTOR JUST

- ve fibre layer in progressive multiple sclerosis using optical coherence tomography. *Brain*. 131: 277-287.
- (213) MacDonal, W.I. y Barnnes, D. (1992) The ocular manifestations of sclerosis multiple 1. Abnormalities of the afferent visual system. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 55: 747-752.
- (214) COHEN, D.J. (1992) Tourette's syndrome: psychopathology of development in a model of neuropsychiatric dysfunction in children. *Psychiatr. Enfant.* 35: 365-419.
- (215) SINGER, H.S.; HAHN, I.H. Y MORAN, T.H. (1991) Abnormal dopamine uptake sites in postmortem striatum from patients with Tourette's syndrome. *Annals. Neurology*. 30: 558-562
- (216) Church, J.A.; Fair, D.A.; Dosenbach, N.U.; Cohen, A.L.; Miezin, F.M.; Petersen, S.E. y Schlaggar, B.L. (2008) Control networks in pediatric Tourette syndrome show immature and anomalous patterns of functional connectivity. *Brain*. En prensa.
- (217) SROUR, M.; LESPÉRANCE, P.; RICHER, F. Y CHOUINARD, S. (2008) Psychopharmacology of tic disorders. J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry. 17: 150-159.
- (218) SINGER, H.S.; BUTLER, I.J.; TUNE, L.E.; SEIFER, W.E. Y COYLE, J.T. (1982) Dopaminergic dysfunction in Tourette's syndrome. *Annals Neurology*. 12: 361-366.
- (219) CATH, D.C.; MEYNEN, G.; DE JONGE, J.L. Y VAN BALKOM, A.J. (2008) Antipsychotics in the treatment of Tourette disorder: a review. *Tijdschr Psychiatr*. 50: 593-602.
- (220) SINGER, H.S. Y WALKUP, J.T. (1991) Tourette syndrome and other tic disorders. Diagnosis, pathophysiology and treatment. *Medicine*. 70: 15-32.
- (221) MELUN, J.P.; MORIN, L.M.; MUISE, J.G. Y DESROSIERS, M. (2001) Color vision deficiencies in Gilles de la Tourette syndrome. *J. Neurological Sci.* 186: 107-110.





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

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
Roche Farma, S.A.

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.