

ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

MONOGRÁFICO

24

ier

Instituto de Estudios Riojanos

ZUBÍA. MONOGRÁFICO
REVISTA DE CIENCIAS.
Nº 24 (2012). Logroño (España).
P. 1-171, ISSN: 1131-5423

DIRECTORA

Purificación Ruiz Flaño

CONSEJO DE REDACCIÓN

Luis Español González

Rubén Esteban Pérez

Rafael Francia Verde

Juana Hernández Hernández

Luis Miguel Medrano Moreno

Patricia Pérez-Matute

Enrique Requeta Loza

Rafael Tomás Las Heras

CONSEJO CIENTÍFICO

José Antonio Arizaleta Urarte

(Instituto de Estudios Riojanos)

José Arnáez Vadillo

(Universidad de La Rioja)

Susana Caro Calatayud

(Instituto de Estudios Riojanos)

Eduardo Fernández Garbayo

(Universidad de La Rioja)

Rosario García Gómez

(Universidad de La Rioja)

José M^a García Ruiz

(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)

Javier Guallar Otazua

(Universidad de La Rioja)

Teodoro Lasanta Martínez

(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)

Joaquín Lasierra Cirujeda

(Hospital San Pedro, Logroño)

Luis Lopo Carramiñana

(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

Fernando Martínez de Toda

(Universidad de La Rioja)

Juan Pablo Martínez Rica

(Instituto Pirenaico de Ecología-CSIC)

José Luis Nieto Amado

(Universidad de Zaragoza)

José Luis Peña Monné

(Universidad de Zaragoza)

Félix Pérez-Lorente

(Universidad de La Rioja)

Eduardo Viladés Juan

(Hospital San Pedro, Logroño)

Carlos Zaldívar Ezquerro

(Dirección General de Medio Natural del Gobierno de La Rioja)

DIRECCIÓN Y ADMINISTRACIÓN

Instituto de Estudios Riojanos

C/ Portales, 2

26071 Logroño

publicaciones.ier@larioja.org

Suscripción anual España (1 número y monográfico): 15 €

Suscripción anual extranjero (1 número y monográfico): 20 €

Número suelto: 9 €

Número monográfico: 9 €

INSTITUTO DE ESTUDIOS RIOJANOS

ZUBÍA

REVISTA DE CIENCIAS

Monográfico Núm. 24

PANORAMA ACTUAL DE LA
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN LA RIOJA

Coordinadora
PATRICIA PÉREZ-MATUTE



Gobierno de La Rioja
Instituto de Estudios Riojanos
LOGROÑO
2012

Panorama actual de la investigación biomédica en La Rioja / coordinadora, Patricia Pérez-Matute. – Logroño : Instituto de Estudios Riojanos, 2012
171 p. : gráf. ; 24 cm – (Zubía. Monográfico, ISSN 1131-5423; 24). – D.L. LR 413-2012
1. Ciencias biomédicas - Investigación - La Rioja. I. Pérez-Matute, Patricia. II. Instituto de Estudios Riojanos. III. Serie
61:001.891(460.21)
57:001.891(460.21)

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de esta publicación pueden reproducirse, registrarse ni transmitirse, por un sistema de recuperación de información, en ninguna forma ni por ningún medio, sea electrónico, mecánico, fotoquímico, magnético o electroóptico, por fotocopia, grabación o cualquier otro, sin permiso previo por escrito de los titulares del copyright.

- © Logroño, 2012
Instituto de Estudios Riojanos
C/ Portales, 2
26001-Logroño, La Rioja (España)
- © Diseño de cubierta e interior: ICE Comunicación
- © Imagen de la cubierta y contracubierta: Detalle de los efectos del tratamiento de 24 horas de un fármaco antirretroviral sobre el adipocito humano (*Patricia Pérez-Matute*). Fotografías con luz ultravioleta del cerebro (a la izquierda) y del corazón (a la derecha) de un ratón transgénico (*Alfredo Martínez*)

Producción gráfica: Reproestudio, S.A. (Logroño)

ISSN 1131-5423
Depósito Legal: LR 413-2012

Impreso en España - Printed in Spain

ÍNDICE

PRESENTACIÓN

Patricia Pérez-Matute (*Coordinadora*) 7-8

PRIMEROS AÑOS DE ANDADURA DEL CIBIR

José Ignacio Nieto (*Consejero de Salud y Servicios Sociales del Gobierno de La Rioja*) 9-10

MARTA PÉREZ-FERNÁNDEZ, JAVIER PÉREZ, JULIO GÓMEZ

Análisis mediante CG-MS de volátiles en el aliento de personas con cáncer en el tracto respiratorio

Study of breath compounds in people that suffer lung cancer 11-21

SARA VELILLA OSÉS, RUTH ABARZUZA CORTAIRE, EVA RODO ARNEDO, ANA IBÁÑEZ MUÑOZ, SARA MARTA GUALLAR LEZA

Seguimiento de un año con Ranibizumab para el edema macular diabético refractario: estudio piloto

One year follow-up of Ranibizumab for refractory diabetic macular edema:

a pilot study 23-32

ELENA DOMÍNGUEZ-GARRIDO

Diagnóstico Molecular: Genética Humana y Salud en La Rioja

Molecular Diagnostic: Human Genetic and Health in La Rioja 33-40

SONIA MARTÍNEZ-HERRERO, IGNACIO M. LARRÁYOZ, LAURA OCHOA-CALLEJERO, JOSUNE GARCÍA-SANMARTÍN, ALFREDO MARTÍNEZ

Producción de ratones modificados genéticamente como modelos de enfermedades humanas

Production of genetically modified mice as models for human diseases 41-52

GERMÁN CUESTO, NURIA DOMÍNGUEZ-ITURZA, LILIAN ENRÍQUEZ-BARRETO, PATRICIA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, GADEA MATA, EMILIO SYRIANI, MIGUEL MORALES

La activación de PI3K controla la formación de sinapsis en el sistema nervioso central

PI3K activation controls synaptic formation in the central nervous system 53-80

ROSETE S. PAIS, ICIAR P. LÓPEZ, JOSÉ G. PICHEL

El sistema de IGFs en la homeostasis y patología del pulmón: implicación en su desarrollo, regeneración tras daño y cáncer no microcítico

The IGF system in lung homeostasis and disease: involvement on pulmonary

development, injury recovery, and non-small cell cancer 81-112

**LAURA VINUÉ, ELENA RUIZ, INÉS OLARTE, SERGIO SOMALO,
BEATRIZ ROJO-BEZARES, FERNANDA RUIZ-LARREA, MYRIAM ZARAZAGA,
YOLANDA SÁENZ, CARMEN TORRES**

Frecuencia y caracterización de integrones en aislados clínicos y alimentarios de *Escherichia coli*. La relación entre los integrones y la multiresistencia a antibióticos
Occurrence and characterization of integrons in clinical and food Escherichia coli isolates. The relation between integrons and antimicrobial multiresistance 113-128

**PATRICIA PÉREZ-MATUTE, JOSÉ RAMÓN BLANCO, LAURA PÉREZ-MARTÍNEZ,
JAVIER AGUILERA-LIZARRAGA, EMMA RECIO, MERCEDES SANZ,
CONCEPCIÓN GARCÍA-GARCÍA, JOSÉ ANTONIO OTEO**

Investigación en VIH y Lipodistrofia en el Hospital San Pedro-Cibir: modelos *in vitro* de adipocitos para el estudio de los efectos tóxicos de fármacos antirretrovirales
Research on HIV and Lipodistrophy at San Pedro Hospital-Cibir: in vitro adipocyte models for the study of toxic effects of antiretroviral drugs..... 129-147

**ARÁNZAZU PORTILLO, SONIA SANTIBÁÑEZ, PAULA SANTIBÁÑEZ,
ANA M. PALOMAR, LARA GARCÍA-ÁLVAREZ, LOURDES ROMERO,
LUIS METOLA, VALVANERA IBARRA, JOSÉ R. BLANCO, JOSÉ A. OTEO**

1987: Un caso de enfermedad de lyme - 2012: Centro de Referencia en Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores
1987: A case of Lyme disease - 2012: Reference Centre of Rickettsioses and Arthropod-Borne diseases..... 149-163

LA ACTIVACIÓN DE PI3K CONTROLA LA FORMACIÓN DE SINAPSIS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

GERMÁN CUESTO¹, NURIA DOMÍNGUEZ-ITURZA¹,
LILIAN ENRÍQUEZ-BARRETO¹, PATRICIA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ¹,
GADEA MATA¹, EMILIO SYRIANI¹, MIGUEL MORALES^{1*}

RESUMEN

Las sinapsis son estructuras en proceso continuo de formación y eliminación. Patologías como el Alzheimer se relacionan con la pérdida de contactos sinápticos, causa fisiológica de pérdida de memoria. Cambiar el número de sinapsis podría ser relevante para el tratamiento de enfermedades neurológicas. El tratamiento con el péptido artificial activador de PI3K, media la sinaptogénesis y espinogénesis en cultivos primarios y en neuronas de hipocampo. El tratamiento también es eficaz en neuronas adultas donde induce un aumento de la densidad de espinas y una mejora de capacidades cognitivas medidas mediante un protocolo de condicionamiento por miedo. La intervención farmacológica de la vía PI3K-Akt-GSK3 podría resultar de interés en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (glaucoma, ELA).

Nuestro laboratorio desarrolla herramientas informáticas que permiten un análisis automático de la densidad sináptica. El presente trabajo resume la investigación del laboratorio de Plasticidad Sináptica Estructural en la vía de PI3K y la sinaptogénesis. Incluimos un artículo sobre las bases genéticas del ELA.

Palabras claves: PI3K, sinapsis, espinas, enfermedades neurodegenerativas.

Synapses are dynamic structures subject to continuous process of formation and elimination. Pathological conditions such as Alzheimer disease, have been

* E-mail: miguel.morales@riojasalud.es.

1. Laboratorio de Plasticidad Sináptica Estructural. Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), C/ Piqueras, 98, 26006 Logroño, La Rioja, España.

related to synapse loss associated with memory impairments; the possibility of changing the number of synapses may be relevant to treat neurological diseases. Here we show that a treatment with an artificial PI3K-activating transduction peptide mediates synaptogenesis and spinogenesis in primary cultures of hippocampal neurons, as well as in CA1 hippocampal neurons in vivo. In addition, the treatment is effective on adult neurons where it induces spinogenesis and enhances cognitive behavior of treated animals in a fear-conditioning assay. The pharmacological intervention PI3K-Akt-GSK3 pathway should be of interest to treat neurodegenerative diseases (glaucoma, ALS).

Our laboratory is developing software tools to automatically analyse synaptic density. The present review covers the works of the Structural Synaptic Plasticity laboratory on PI3K pathway and functional synaptogenesis. We have included a chapter devoted to the genetic bases of ALS.

Key words: *PI3K, synapsis, spines, neurodegenerative disease.*

1. LA VIA DE PI3K

El enzima Fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K) es una quinasa de lípidos cuya activación implica una importante regulación fisiológica en multitud de tejidos. Se encuentra en todos los eucariotas incluyendo los mamíferos con sus correspondientes versiones homólogas.

En mamíferos PI3K es crucial en el desarrollo temprano del sistema nervioso, con un importante papel en morfogénesis dendrítica (Jaworski y Sheng, 2006), polaridad axonal y crecimiento (Jiang y Rao, 2005), neurogénesis, diferenciación neuronal, y migración. En el individuo adulto PI3K presenta también un papel regulador en formación de memorias (Lin *et al.*, 2001), acumulación de receptores AMPA en la densidad postsináptica (Arendt *et al.*, 2010), plasticidad sináptica (Acebes *et al.*, 2012) y sinaptogénesis (Cuesto *et al.*, 2011).

El enzima PI3K fosforila lípidos de membrana formando parches de fosfoinosítoles en regiones específicas de la membrana plasmática. En estado trifosforilado, estos lípidos funcionan como mensajeros secundarios, dando lugar a la amplificación y la propagación de la cascada de señalización. En condiciones de inactividad, PI3K se encuentra en el citoplasma celular, siendo su activación en la mayoría de los casos iniciada por factores de crecimiento, como es el caso de IGF (Insulin-like Growth Factor) o PDGF (Platelet Derived Growth Factor). En condiciones fisiológicas estos factores de crecimiento constituyen los ligandos de receptores específicos de membrana denominados Receptores Tirosina Quinasa (RTKs). En mamíferos existen 3 clases de PI3K (Wymann y Pirola, 1998). La clase más ampliamente investigada y el objeto de estudio por parte del grupo de Plasticidad Sináptica Estructural es la clase IA, que se subdivide a su vez en tres isoformas: PI3K α , PI3K β y PI3K δ activándose todas ellas mediante los RTKs antes descritos, o la unión a integrinas en el caso de PI3K δ . En la clase IB de PI3K tam-

bién encontramos otra vía de activación, mediada por receptores acoplados a proteínas G (Osmond *et al.*, 2010).

Molecularmente PI3K IA es un heterodímero formado por una subunidad reguladora y una subunidad catalítica. Ambas se encuentran siempre unidas entre sí a través del dominio intermedio iSH2 de la subunidad reguladora al sitio de unión al adaptador (ABS por sus siglas en inglés) de la subunidad catalítica (Wu *et al.*, 2007).

p85 α (PIK3R1a), p85 β (PIK3R2) y p55 γ (PIK3R3) se corresponden con las subunidades reguladoras de los tipos PI3K α , PI3K β y PI3K δ respectivamente. En condiciones de no-activación la subunidad reguladora de PI3K adopta una conformación tal que impide que la subunidad catalítica pueda desarrollar su función (Yu *et al.*, 1998). Al unirse un factor de crecimiento a su RTK específico de membrana tiene lugar la fosforilación de diversos residuos de tirosina de la cara citoplasmática del receptor. Cuando p85 reconoce a estos residuos se une específicamente, lo que comporta un cambio de conformación que libera la actividad catalítica. La unión de RTK a p85 puede estar mediada por otras subunidades proteicas, como es el caso de IRS-1 para el receptor de insulina o Ras-GRB2 en el caso de otros RTKs (Cully *et al.*, 2006).

Las subunidades catalíticas de PI3K reciben el nombre de p110 α (PIK3CA), p110 β (PIK3CB) y p110 δ (PIK3CD) para el tipo de PI3K correspondiente. El cambio conformacional que comporta la unión de p85 a membrana a través del RTK activado relaja la inhibición de p85 sobre p110, promoviendo así la actividad catalítica de PI3K. Ésta consiste en la fosforilación en posición 3 del fosfatidil inositol (4,5) bifosfato (PIP₂) convirtiéndolo en fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato (PIP₃).

La regulación negativa de PI3K viene dada por la enzima PTEN (phosphatase and tensin homolog) la cual presenta actividad fosfatasa, revirtiendo así el estado de fosforilación de la región de membrana rica en fosfoinositoles de PIP₃ a PIP₂. El equilibrio entre la actividad de PI3K/PTEN determinará la actividad neta del sistema y por lo tanto la activación de respuestas, muchas de las cuales implican transcripción de genes o cambios estructurales profundos.

Siguiendo con la cascada de señalización, la formación de parches de PIP₃ de membrana permite el anclaje de diversas enzimas citoplasmáticas que presentan el dominio homólogo de Pleckstrina (PH) en su estructura como es el caso de Akt (también conocida como PKB) o PDK1 entre otras. Secuencialmente, una vez se ha formado un parche de fosfoinositoles en membrana, se produce el anclaje tanto de Akt, como de PDK1 en membrana. El cambio de conformación sufrido en PDK1 debido al anclaje favorece su actividad quinasa que recae sobre el residuo Thr308 de Akt. Para la completa activación de Akt es necesaria una segunda fosforilación en el residuo Ser473, en este caso llevada a cabo por el complejo enzimático mTORC2 (Fayard *et al.*, 2010). (Fig. 1).

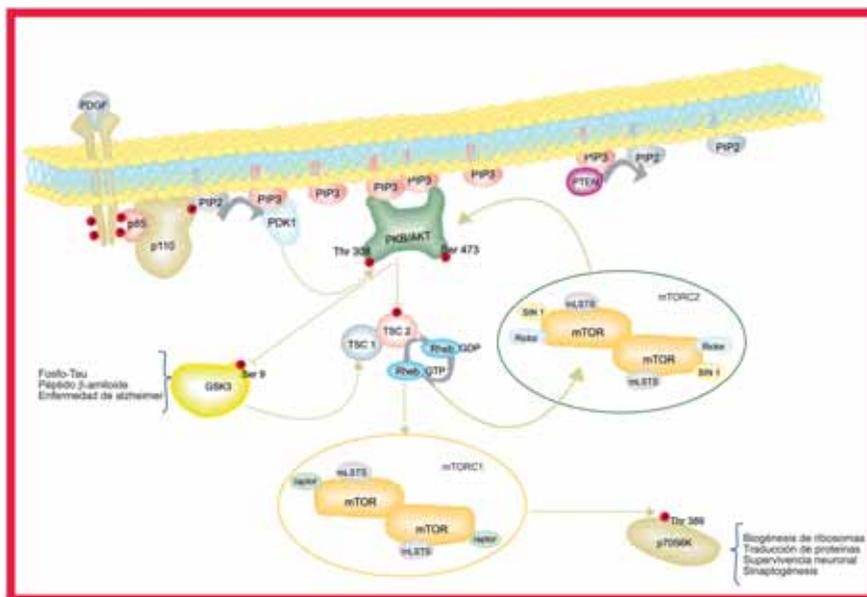


Figura 1. Vía de señalización PI3K – Akt.

La quinasa Akt presenta multitud de sustratos que actúan como efectores directos, por tanto, la mayoría de sus funciones vendrán moduladas por la activación de diversas rutas de modo paralelo.

A nivel neurofisiológico, uno de los importantes efectores de Akt es GSK3β (fig. 1). GSK3β es una quinasa atípica, ya que al contrario que la mayoría de quinasas se inactiva al fosforilarse, presentando así una actividad catalítica máxima en condiciones de quiescencia celular. Otro rasgo atípico es la necesidad de que sus sustratos presenten una pre-fosforilación para que puedan ser a su vez fosforilados por GSK3β, fenómeno que se conoce como priming (Bradley *et al.*, 2003).

GSK3β presenta un importante papel en el desarrollo axonal, de manera que cultivos con un fondo con GSK3β constitutivamente activo presentan neuronas que carecen de axón. Asimismo se conduce a la formación de múltiples axones cuando la actividad de GSK3β se elimina en su totalidad (Jiang y Rao, 2005; Yoshimura *et al.*, 2006).

La otra función importante de GSK3β es la regulación de la estabilidad del citoesqueleto axonal que ejerce por fosforilación sobre proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Este es el caso de la proteína Tau, que se separa de los microtúbulos axonales al fosforilarse vía GSK3. La alteración funcional de GSK3 da lugar a la hiperfosforilación de Tau, que tiende a agregar formando ovillos neurofibrilares insolubles. Dicha hiperfosforilación también conduce a la inestabilización del citoesqueleto axonal que acaba por dege-

nerar, siendo ambos procesos responsables en parte de la muerte neuronal y a su vez característicos de la Enfermedad de Alzheimer.

En el grupo de Plasticidad Sináptica Estructural del CIBIR se ha diseñado un péptido de transducción capaz de activar la vía PI3K a niveles fisiológicos denominado PTD4-PI3K Activador (PTD4-PI3KAc). La utilización de este péptido en modelos *in vitro* e *in vivo* ha servido para estudiar el efecto de la activación de PI3K sobre la sinaptogénesis, espinogénesis y memoria asociativa (Cuesto *et al.*, 2011). El péptido cuenta con dos dominios, uno de transducción y uno activador. La entrada del péptido al interior celular está mediada por el dominio sintético de transducción PTD4, que es resultado de una modificación del factor de transcripción TAT del VIH y que presenta el motivo Tyr-Ala-Arg-Ala-Ala-Ala-Gln-Ala-Arg-Ala (Ho *et al.*, 2001).

El dominio activador de PI3K se corresponde con los residuos mínimos necesarios para la unión a p85, en este caso Gly-Ser-Asp-Gly-Gly-pTyr-Met-Asp-Met-Ser (Derossi *et al.*, 1998). Estos residuos mimetizan la parte citoplasmática fosforilada del receptor de PDGF. De este modo, el péptido, al liberarse en el medio es introducido al interior de la célula y reconocido por la subunidad reguladora de PI3K a quien se une, activando así la subunidad catalítica p110 e iniciándose la cascada de fosforilaciones.

Los antecedentes de este trabajo se refieren a *Drosophila melanogaster*, donde la sobreexpresión de la subunidad catalítica Dp110 (homóloga a p110 en mamíferos) conduce al incremento de sinapsis funcionales tanto en unión neuromuscular de larvas como en lóbulo olfativo de moscas adultas, todo ello de manera independiente del tamaño celular y de la proliferación (Martin-Peña *et al.*, 2006). Asimismo, su sobreexpresión en el elemento presináptico de la unión neuromuscular conduce a un incremento en el número de receptores de glutámico GluRII y a una mayor densidad postsináptica, implicando a PI3K en el papel activo en la transmisión sináptica. (Jordán-Álvarez *et al.*, 2012). En el mismo sentido, el dominante negativo de Dp110 así como la sobreexpresión de GSK3 conducen a una pérdida de contactos sinápticos en los glomérulos olfativos (Acebes *et al.*, 2011).

Respecto a la implicación de PI3K y la sinaptogénesis en mamíferos, en el grupo de Plasticidad Sináptica Estructural se ha mostrado cómo la activación controlada de PI3K/Akt da lugar a un incremento en el número de contactos sinápticos. Dicho incremento se consigue tanto en cultivos primarios de neuronas de hipocampo como en animales adultos. Además estos cambios estructurales modifican el comportamiento de los animales en tanto que mejoran su capacidad de aprendizaje (Cuesto *et al.*, 2011).

Evidencias de otros grupos apuntan del mismo modo: la eliminación selectiva de PTEN promueve el incremento en la densidad sináptica asociado con una hipertrofia dendrítica (Kwon *et al.*, 2006). Por último, los complejos mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) y S6 quinasa, son dos elementos por debajo de la cascada de PI3K/Akt que se ha demostrado están presentes en plasticidad sináptica y en sinapsis (Tang *et al.*, 2002, Tsokas *et al.*, 2005).

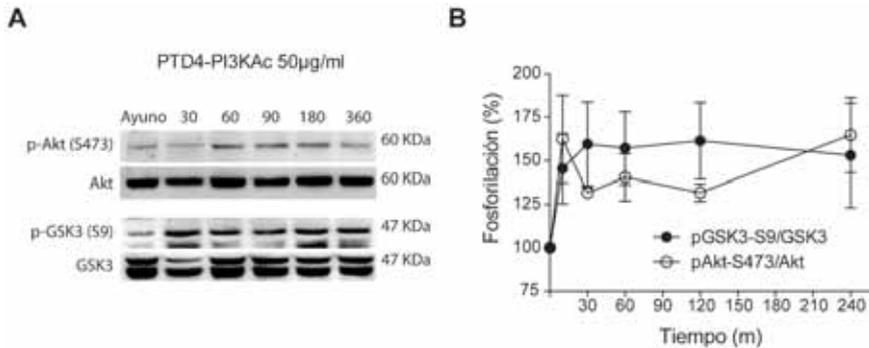


Figura 2. PTD4-PI3KAc activa la vía de señalización de PI3K/Akt. Cultivos de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron llevados a un 80% de confluencia y privados de suero durante 16h tras las cuales fueron inducidos con 50 µg/ml de PTD4-PI3KAc. **A.** Inmunoblot representativo que muestra los cambios en el estado de fosforilación de Akt y GSK3 en una ventana temporal de 6 horas. **B.** Gráfico que resume el efecto activador de la vía PI3K/Akt. La adición de PTD4-PI3KAc incrementó los niveles de pAkt S473 y de pGSK3 S9 significativamente en comparación con cultivos tratados únicamente con PTD4. Los niveles de ambos reporteros mantienen una activación cercana al 50% tras 4 horas.

1.1. PTD4-PI3KAc posee actividad biológica activando PI3K

En primer lugar, para demostrar que PTD4-PI3KAc activa la cascada de señalización de PI3K/Akt en células nerviosas se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y y se añadió PTD4-PI3KAc a una concentración de 50 µg/ml al medio de cultivo. Seguidamente se cuantificaron los niveles de Akt fosforilado en la Ser 473 mediante la técnica de Western Blot, lo que mostró un 158,7% de incremento respecto al basal a los 30 minutos y prolongándose en el mismo rango tras 240 minutos (fig. 2). Como control negativo se añadieron 50 µg/ml de péptido PTD4 sin dominio activador, no registrándose con éste incrementos significativos en los valores de pAkt. Estos resultados muestran que el péptido permite una activación leve pero sostenida en el tiempo (datos no mostrados).

1.2. La actividad de PI3K incrementa la densidad sináptica

Para medir los cambios en la densidad sináptica se utilizó la técnica de la inmunocitoquímica con doble marcaje de proteína presináptica: por una parte bassoon, que forma parte de la zona activa y por otra sinapsina, que se encuentra integrada en las vesículas sinápticas (Ziv y Garner, 2004).

Se procesó la imagen digital y se consideró como sinapsis positiva la colocalización de ambos marcajes (fig. 3A). Para facilitar el conteo, el grupo de Plasticidad Sináptica Estructural, junto con el Departamento de Matemáticas y Computación de la Universidad de La Rioja ha desarrollado una aplicación para el programa de tratamiento de imágenes de código libre Image J. La apli-

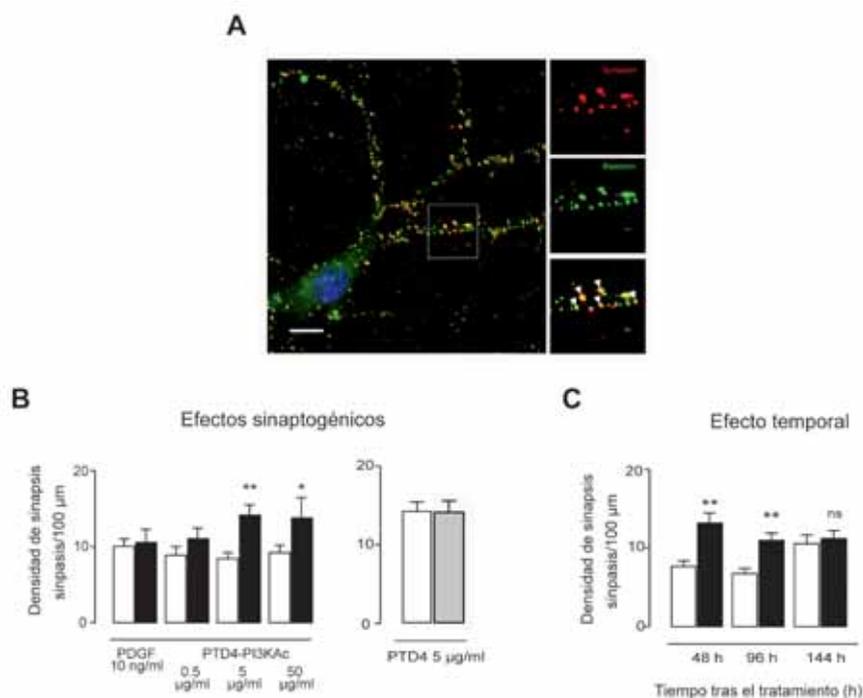


Figura 3. Concentración y tiempo mínimos necesarios para observar el efecto sinaptogénico dependiente de PI3K. **A.** Detalle de neurona de hipocampo de rata 12 DIV teñida con los anticuerpos anti-sinapsina policlonal y anti-bassoon monoclonal. Las sinapsis maduras fueron cuantificadas solo en caso de presentar punteo con doble marcaje y en caso de pertenecer a una dendrita basal empezando de un cuerpo neuronal claramente identificado. Mediante el plugin de ImageJ SynapCountJ se procedió a la cuantificación automática. **B.** Curva dosis-respuesta tras aplicar PTD4-PI3KAc a diferentes concentraciones en cultivo de neuronas de hipocampo de 10 DIV y cuantificando la densidad sináptica a 12DIV. El máximo efecto se obtiene a 5 μg/ml, no obteniéndose mejores resultados con 50 μg/ml. La presencia de PTD4 durante 48 horas en cultivo no muestra un incremento en la densidad sináptica. (t-Student). **C.** Vida media del péptido *in vitro*. El efecto sinaptogénico tras una única aplicación de 5 μg/ml de PTD4-PI3KAc en cultivos de 2 DIV muestra un incremento de la densidad sináptica que perdura durante 4 días. La medición de la densidad sináptica revela cambios significativos a 96h, pero no a 144h. (t-Student).

cación recibe el nombre de SynapCountJ y permite determinar automáticamente la densidad sináptica de neuronas en cultivo.

Para determinar la dosis mínima con actividad biológica se aplicaron diferentes concentraciones de PTD4-PI3KAc y tras 48 horas se midió la densidad sináptica en cultivos de 12 días *in vitro* (DIV). El resultado revela que para observar cambios sinaptogénicos significativos necesitamos 5 μg/ml, siendo el efecto muy similar a la dosis de 50 μg/ml (Cuesto *et al.*, 2011) (fig. 3B).

Como control negativo se añadieron 50 μg/ml de PTD4 sin dominio activador tras lo que no se observó un incremento significativo del número de sinapsis (fig. 3B derecha).

La ventana de actividad de una sola aplicación del péptido alcanzó el límite de las 96 horas; tras este lapso no se determinó diferencia en la densidad sináptica a las 144 horas de la inducción con respecto a su control (fig. 3C).

Para corroborar el efecto sinaptogénico, y demostrar que este incremento en el número de sinapsis comportaba una mayor expresión proteica, se utilizó la técnica del Western Blot usando como proteínas reporteras: una presináptica (sinapsina) y otra postsináptica (PSD95). También se midió la activación de la vía PI3K/Akt cuantificando la ratio entre pAkt S473 y Akt total.

En los resultados observamos que la incubación de 50 µg/ml de PTD4-PI3KAc durante 48 horas da lugar a un incremento en la expresión de Sinapsina que alcanza el $129.8 \pm 18.5\%$ respecto a cultivos tratados con PTD4. En el caso de PSD95 el incremento llega al $127.1 \pm 7.6\%$. Al tratar con un inhibidor específico de PI3K, el LY294002 a 5 µM, se observa una caída en los niveles de sinapsina, que se sitúa en el $64.9 \pm 10.5\%$ respecto al basal (Cuesto *et al.*, 2011). (Fig. 4A).

En el tratamiento de neuronas de hipocampo en cultivo con PTD4 sin dominio activador no vemos alteración significativa en ninguno de los reporteros al comparar los valores de expresión proteica y fosforilación del efector Akt con el control negativo, confirmando así que la activación de la vía y el efecto sinaptogénico viene dado por el dominio activador. (Fig. 4A).

Tras esta caracterización del efecto sinaptogénico se llevaron a cabo diversos tipos de experimentos en cultivos primarios de hipocampo:

En primer lugar se realizó un experimento crónico, en que a partir de 2 DIV se aplicaron 5 µg/ml de PTD4-PI3KAc cada dos días hasta 12 DIV. Los cultivos se fijaron, se procesaron para inmunocitoquímica y se procedió a medir la densidad sináptica partiendo de 6 DIV hasta 14DIV (Fig. 4B). El incremento porcentual en la sinaptogénesis alcanza el $69,5 \pm 8.4\%$ y $51.2 \pm 13.3\%$ a 6 y 8 DIV respectivamente, bajando para estabilizarse en los valores $32.8 \pm 11.3\%$, $24.0 \pm 9.0\%$ y $25.7 \pm 0.8\%$ a 10, a 12 y 14 DIV respectivamente (Cuesto *et al.*, 2011).

También se testó el efecto agudo en cultivos considerados adultos de 21 DIV obteniéndose un incremento en este caso del $38.8 \pm 8.1\%$ (Cuesto *et al.*, 2011).

Para concluir, se trataron cultivos de 12 DIV con 5 µM del inhibidor específico de PI3K LY294002 con lo que se obtuvo una disminución del número de sinapsis por cada 100 µm de un $40.9 \pm 6.3\%$ respecto al control en 48h de tratamiento, resultado que confirma nuevamente la implicación de PI3K en este efecto sinaptogénico (Cuesto *et al.*, 2011) (fig. 4B).

En cultivos primarios, la mayoría de contactos sinápticos hipocampales son glutamatérgicos (Rao *et al.*, 1998) pero existe también una proporción de contactos inhibidores, que alcanza aproximadamente un 6% (Benson *et al.*, 1994). Para estudiar si la sinaptogénesis de *novο* se reducía solo a contactos excitadores, o por el contrario también implicaba el crecimiento de sinapsis

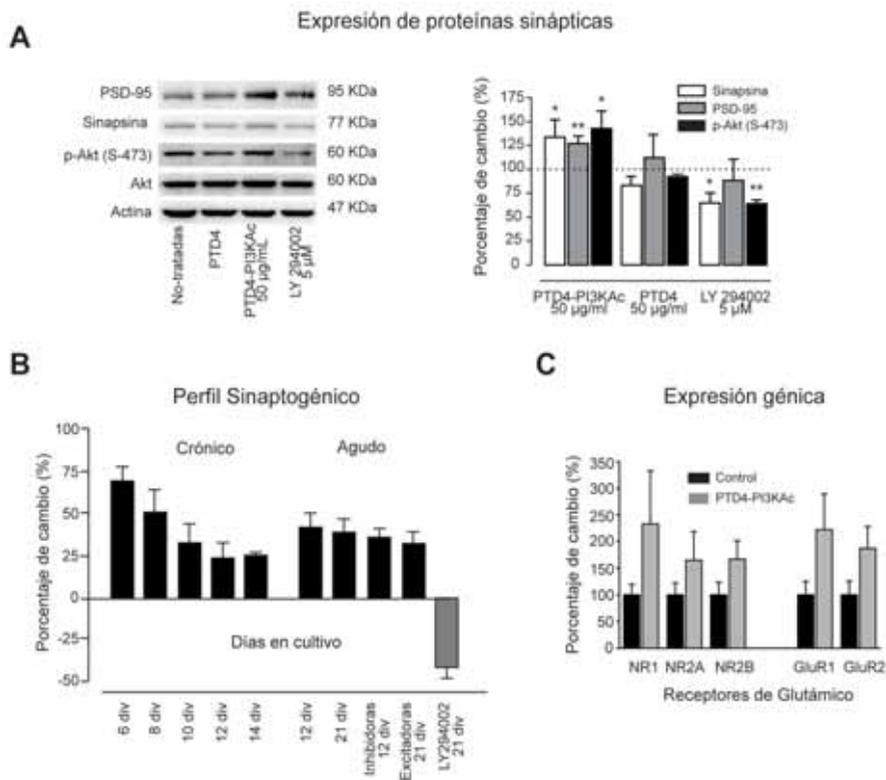


Figura 4. Efecto sinaptogénico dependiente de PI3K en neuronas. **A.** Inmunoblot representativo que muestra los cambios en PSD95, sinapsina y pAkt Ser473 en cultivos de neuronas sembradas a alta densidad tratados con PTD4-PI3KAc (50 µg/ml), PTD4 (50 µg/ml) o LY294002 (5 µM). El tratamiento se hizo a 10 DIV y las células se lisaron a 12 DIV. Los cultivos tratados con PTD4-PI3KAc presentan niveles más elevados de pAkt S473, de sinapsina y de PSD95 en relación a los cultivos no tratados. El péptido de transducción PTD4 por sí mismo no modifica los niveles de expresión de proteína ni de fosforilación de Akt. LY294002 da lugar a una reducción tanto de sinapsina como de la fosforilación de Akt. **B.** PTD4-PI3KAc incrementa la densidad sináptica en cultivos. En la parte izquierda se presentan los resultados del tratamiento crónico, que muestra curva bifásica con un efecto más pronunciado en los primeros días en cultivo seguido por un declive (8 y 10 DIV) hasta mostrar una estabilización en un valor aproximado al 25% por encima del basal. A la derecha se muestran los resultados de una única aplicación a 10 DIV y fijación del cultivo a 12 DIV. Tanto en cultivos jóvenes (12 DIV), como en adultos (21 DIV), como en sinapsis excitadoras a 21 DIV e inhibitoras a 12 DIV se alcanzó un incremento aproximado del 45% respecto a cultivos no tratados. La aplicación de 5 µM de LY294002 resulta en una disminución de la densidad aproximada de un 50%. **C.** La activación de PI3K implica un incremento de la expresión génica. Cultivos de 10 DIV fueron inducidos con 50 µg/ml de PTD4-PI3KAc y lisados a 12 DIV para extracción de RNA total y posterior retrotranscripción a cDNA. Mediante sondas de cDNA específicas de receptores de NMDA y glutámico se procedió a la cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa. El resultado concuerda con el obtenido en la expresión de proteínas; tras 48 horas de incubación se muestra un incremento de la expresión génica que alcanza casi un 250% por encima del basal para el caso de NR1, y un 150% para NR2A y NR2B. En el caso de GluR1 y GluR2 de da un incremento de la expresión que alcanza aproximadamente un 225% respecto cultivos no tratados.

inhibidoras, medimos el incremento sináptico en cultivos de 12DIV donde marcamos con Bassoon/PSD95 (proteína postsináptica específica de contactos excitadores) y en otros con sinapsina/Gefirina (proteína postsináptica de contactos GABAérgicos y glicina) (Kornau *et al.*, 1995, Kneussel y Betz, 2000) (Fig. 4B). Los datos experimentales indican que la activación de PI3K incrementa la densidad de sinapsis excitadoras en un $29.1 \pm 8.2\%$ y la de sinapsis inhibitoras en un $36.3 \pm 5.1\%$, mostrando así un incremento sináptico similar en ambos tipos de sinapsis (Cuesto *et al.*, 2011).

En el conjunto de experimentos en que se ha medido sinaptogénesis y expresión de proteína sináptica obtenemos resultados en la misma dirección, y ésta apunta a que PI3K presenta un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento de sinapsis independientemente de si se trata de sinapsis excitadoras o inhibitoras. Asimismo, la aplicación única del péptido presenta una ventana temporal que se alarga hasta las 96 horas.

Por último, se analizó el perfil de expresión génica tras la activación de PI3K 48 horas después de la adición del péptido en cultivos de 10 DIV. Mediante PCR cuantitativa se midió la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor de NMDA y las subunidades GluR1 y GluR2 del receptor de glutámico encontrándose un incremento que bascula en un rango de 150 a 250% respecto de los cultivos control (Enríquez-Barreto *et al.*; en preparación). El incremento en la expresión de receptores sinápticos glutamatergicos concuerda con el resto de resultados que muestran un aumento de la densidad sináptica ligado a una mayor expresión proteica (fig. 4C).

En suma, estos resultados apoyan la tesis de que PI3K/Akt está implicado directamente en la sinaptogénesis en vertebrados independiente del tipo sináptico, el crecimiento y la ramificación neurítica. Este proceso implica tanto el aumento en los niveles de expresión de receptores como de proteína sináptica.

2. ESPINAS DENDRÍTICAS Y PI3K

La mayoría de las sinapsis excitadoras en el cerebro de los mamíferos tienen lugar en unas microestructuras denominadas espinas dendríticas. Descubiertas por Santiago Ramón y Cajal en el año 1888, constituyen una de sus contribuciones más importantes a la neurociencia actual. Cajal propuso que las espinas permitían conectar los axones con las dendritas, constituyendo una característica morfológica fundamental de las neuronas. En efecto, las espinas dendríticas representan el principal sitio postsináptico de establecimiento de las sinapsis glutamatergicas, son claves en la plasticidad del cerebro, y desde su descubrimiento se han intentado relacionar con el “almacenamiento” de la memoria. Las alteraciones en su densidad o morfología están relacionadas con enfermedades y desórdenes del sistema nervioso.

2.1. Papel fisiológico de las espinas dendríticas

Desde su descubrimiento, Cajal propuso que las espinas, al establecer contactos con los axones, permitían el aumento de la conectividad de las den-

dritas (Ramón y Cajal, 1899). Hipótesis más modernas también establecen que las espinas son compartimentos bioquímicos que permiten mantener una plasticidad sináptica específica dependiente de las señales recibidas, lo cual permite individualizar la respuesta postsináptica correspondiente. La plasticidad que caracteriza a tales conexiones otorga al circuito la capacidad de “aprender” o de “adaptarse” a nuevas circunstancias o experiencias.

Existe una gran heterogeneidad relativa a la forma y tamaño que poseen las espinas dendríticas. De manera muy general y arbitraria éstas se clasifican en “stubbies” (espinas que no poseen cuello), “thin” (espinas pequeñas) y “mushroom” (espinas grandes con forma de champiñón) (Fig. 5). Las espinas “thin” y “mushroom” poseen un cuello que las separa del eje de la dendrita, éste puede ser pequeño o puede llegar a medir algunas micras en longitud (Bourne y Harris, 2007). Se ha sugerido que la geometría del cuello controla la cinética y la magnitud de la respuesta postsináptica (Hering y Sheng, 2001).

Existen también unas estructuras consideradas precursoras de las espinas: los filopodios. Los filopodios son muy dinámicos, emergen y se retraen rápidamente de la dendrita y aparecen principalmente durante estadios tempranos de la sinaptogénesis, siendo muy abundantes en el cerebro durante las primeras semanas postnatales in vivo. Las observaciones experimentales proponen que los filopodios podrían indicar el contacto presináptico a la dendrita, permitiendo la formación de una sinapsis a partir de la cual se formaría una espina. La transición de filopodio en espina parece ser un proceso reversible regulado además por factores locales como la actividad sináptica (Hering y Sheng, 2001; Calabrese *et al.*, 2006).

Las espinas no son estructuras rígidas. Pueden cambiar su forma y su tamaño de manera dinámica en cuestión incluso de segundos a minutos o de horas a días. El aumento de la movilidad de las espinas se observa principalmente durante periodos de sinaptogénesis, durante los cuales las espinas pueden elongarse e interactuar físicamente con terminales axonales próximos (Dunaevsky *et al.*, 1999; Hering y Sheng, 2001). La dinámica y movilidad de las espinas está regulada durante el desarrollo, con una tendencia a estabilizarse durante la maduración del sistema nervioso, aunque una pequeña proporción de las mismas continúa manteniendo una cierta dinámica en el cerebro maduro (Dunaevsky *et al.*, 1999; Bourne y Harris, 2007).

Las espinas transitorias son pequeñas, pueden emerger y desaparecer en cuestión de unos pocos días, mientras que las espinas grandes, las denominadas “mushroom” pueden permanecer durante meses. Estas espinas grandes tienen densidades postsinápticas mayores que permiten el anclaje de una mayor cantidad de receptores de glutamato tipo AMPA, lo cual permite que estas sinapsis sean funcionalmente más eficaces. A diferencia de las espinas “thin”, las “mushroom” pueden contener retículo endoplásmico liso y polirribosomas para la síntesis local de proteínas. Estas características sugieren que las espinas “mushroom” son más estables y están relacionadas con la memoria. En contraste, las espinas “thin” se forman y se retraen rápidamente en respuesta a niveles diferentes de actividad sináptica. Éstas contienen densidades postsinápticas más

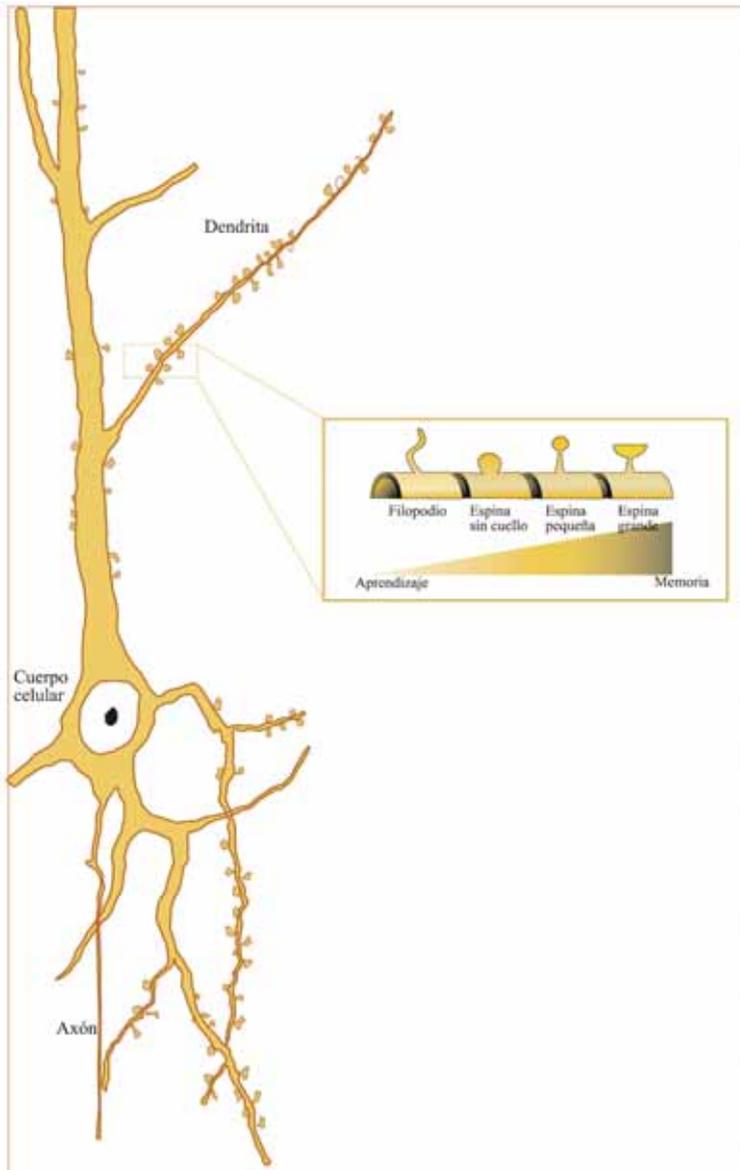


Figura 5. Dibujo esquemático de una neurona piramidal en el cual aparecen identificadas las principales partes de la misma: cuerpo celular, axón y dendritas. Nótese la presencia de protuberancias en las dendritas: espinas dendríticas. En el recuadro se representa la clasificación morfológica general de los tipos de espinas: filopodios (considerados precursores de espinas), stubbies (espinas que no poseen cuello o cuyo cuello es muy pequeño), thin (espinas con cuello y de cabeza pequeña), mushroom (espinas con cuello y una cabeza de gran tamaño). Las espinas con cabezas pequeñas están principalmente relacionadas con eventos de aprendizaje, debido a su dinámica y plasticidad; mientras que aquellas que poseen cabezas grandes se corresponden con funciones de memoria, debido a la fuerza de la sinapsis a la que están asociadas y a la estabilidad que las caracteriza.

pequeñas que albergan principalmente receptores tipo NMDA, y mantienen una alta flexibilidad estructural según las señales que reciben, haciéndolas mejores candidatas para funciones de aprendizaje (Bourne y Harris, 2007).

2.2. Enfermedades y desórdenes del sistema nervioso relacionados con las espinas dendríticas

Alteraciones en la densidad y distribución, en la forma y tamaño, e incluso en la ultraestructura de las espinas están relacionadas de manera específica con diversas enfermedades y desórdenes neuropsiquiátricos, especialmente con aquellos que implican un déficit en el procesamiento de la información. Tanto el aumento como la disminución en la densidad de espinas conducen a anomalías y patologías del sistema nervioso que correlacionan con deficiencias en la conectividad sináptica y en la plasticidad cerebral (Fiala *et al.*, 2002; Penzes *et al.*, 2011).

El aumento en la densidad de espinas se ha descrito, por ejemplo, en pacientes con autismo, en los cuales se observa un incremento en la densidad de espinas en dendritas apicales de neuronas piramidales en la corteza frontal y en los lóbulos temporales y parietales. En este caso, el aumento del número de espinas está correlacionado con una disminución de las funciones cognitivas. Tales observaciones están en consonancia con hipótesis que sugieren que el autismo se caracteriza por una hiperconectividad en circuitos locales y entre distintas áreas del cerebro (Penzes *et al.*, 2011). En el síndrome del X frágil, desorden que cursa con retraso mental y comportamientos autistas, también se ha descrito un aumento de la densidad de espinas (Fiala *et al.*, 2002).

La pérdida permanente de espinas es característica en la mayoría de los procesos de retraso mental, en el síndrome alcohólico fetal y en la epilepsia (Fiala *et al.*, 2002). En pacientes con esquizofrenia, por ejemplo, también se ha podido demostrar que existe una pérdida de espinas en la corteza dorsolateral prefrontal, en las neuronas piramidales del giro temporal superior, principalmente en el área de la corteza auditiva primaria, y en el hipocampo (Penzes *et al.*, 2011).

En la enfermedad de Alzheimer, como se describirá más adelante, tiene lugar una disfunción sináptica muy temprana que comienza en los primeros estadios de la enfermedad, previa a la muerte neuronal, y que empeora progresivamente con el curso de la misma (Selkoe, 2002; Penzes *et al.*, 2011). Como consecuencia de esta pérdida de sinapsis, se produce también una pérdida de espinas dendríticas en el hipocampo y en la corteza cerebral. Curiosamente, algunos estudios han demostrado que el cerebro tiene la capacidad de compensar la pérdida sináptica produciendo, por ejemplo, un aumento en el tamaño de las espinas que permanecen (Penzes *et al.*, 2011).

2.3. Sobreactivación de PI3K y su efecto en la espinogénesis

En el laboratorio de Plasticidad Sináptica Estructural se estudian los efectos de la sobreactivación controlada de PI3K sobre la espinogénesis *in vitro* e *in vivo*.

2.3.1. *In vitro*

Nuestro modelo de estudio *in vitro* son cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas neonatas. En estos cultivos transfectamos las células con un vector actina-eGFP; así, dentro de un mismo cultivo donde hay miles de células, obtenemos neuronas aisladas que expresan la proteína verde fluorescente. Las espinas dendríticas son estructuras ricas en actina, y esto permite estudiar los cambios espinogénicos producidos tras los distintos tratamientos utilizando el péptido activador PTD4-PI3KAc.

Hemos observado que en cultivos de tres semanas, 48 horas después de la administración del péptido, la activación de PI3K produce un aumento de la densidad de espinas dendríticas de aproximadamente un 22% (Cuesto *et al.*, 2011). Actualmente estamos estudiando el efecto de la actividad neuronal en la formación de nuevas espinas. Para ello analizamos el efecto de PTD4-PI3KAc en presencia de TTX (bloqueador de la transmisión sináptica) y/o APV (antagonista no competitivo del receptor de NMDA). Con estos tratamientos podremos determinar si es necesaria la señal presináptica para inducir la formación de las nuevas espinas mediadas por la sobreactivación de PI3K. Los primeros datos parecen indicar que el efecto en la densidad de espinas dendríticas es parcialmente independiente de la actividad sináptica (Enríquez-Barreto *et al.*, en preparación).

En paralelo y mediante estudios de *time-lapse* en microscopía confocal, analizamos la tasa de formación de nuevas espinas. El empleo de cultivos transfectados con actina-GFP nos permite visualizar en tiempo real los cambios en la densidad de estas estructuras (fig. 6). De esta manera se pueden cuantificar parámetros como el número de espinas estables, espinas de nueva aparición y espinas que desaparecen; así podemos determinar si el aumento en la densidad es debido a la aparición de nuevas espinas y/o a una disminución en la tasa de eliminación (estabilización de las ya formadas).

2.3.2. *In vivo*

Se ha estudiado también el efecto de la sobreactivación de PI3K en ratas adultas de 3 meses de edad tras la administración del péptido mediante inyección estereotáxica en la región CA1 del hipocampo dorsal. Los primeros resultados indican que, transcurridas 72 horas desde la inyección del péptido, se observa un aumento del 26% en la densidad de espinas en las dendritas basales de neuronas piramidales de esta región (Cuesto *et al.*, 2011).

2.4. Contextual Fear Conditioning.

Se llevaron a cabo dos experimentos para evaluar si la inyección intracerebroventricular de PTD4-PI3KAc podía potenciar el establecimiento de nuevas memorias de eventos traumáticos, ya que éstos se relacionan íntimamente con el eje amígdala-hipocampo (Kim y Fanselow, 1992; López-Fernández *et al.*, 2007).

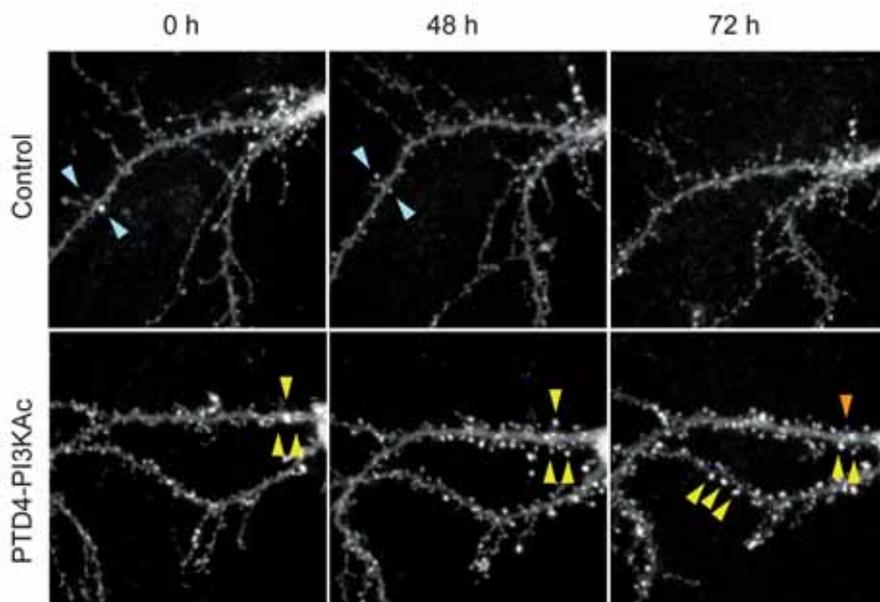


Figura 6. Fotografías correspondientes a películas de 14 minutos en dendritas primarias de neuronas en cultivo en un caso control y en un tratamiento con PTD4-PI3KAc. La misma zona se registra transcurridas 24, 48 y 72 horas en ambas condiciones. En todos los casos se cuantifican los siguientes parámetros: número de espinas estables, espinas de nueva aparición y espinas que desaparecen. Este estudio permite responder a la pregunta de si el aumento en la densidad de espinas es debido a la aparición de nuevas espinas y/o a una disminución en la tasa de eliminación (estabilización de las ya formadas). Flechas azules indican espinas que se mantienen, las flechas amarillas indican espinas de nueva aparición, la flecha naranja indica una espina de nueva aparición que ha comenzado a retraerse.

El primer experimento se realizó con un protocolo dependiente tanto de hipocampo como de amígdala que toma el nombre de Condicionamiento Contextual por Miedo (CFC por sus siglas en inglés). En el segundo caso, con animales diferentes, se introdujo un estímulo auditivo en el condicionamiento, haciéndolo así independiente de hipocampo y dependiente de amígdala. Este protocolo se llama Condicionamiento Auditivo por Miedo (AFC).

Ambos protocolos son muy parecidos y constan de tres fases que tienen lugar en tres días. Brevemente: el primer día se llevó a cabo el condicionamiento en que se colocó al animal dentro de un contexto totalmente nuevo: una jaula cubicular de 30 x 37 x 25cm equipada con una base de rejilla metálica que emite un pequeño shock eléctrico de 0,5mA durante 1s cuando es requerido. Inicialmente se dejó al animal explorar libremente la nueva jaula durante 180s tras los cuales se procedió a dar tres descargas eléctricas separadas entre sí por un minuto. Transcurridos los 6 minutos de la experiencia se retorna el animal a su jaula. Para la variante AFC se procedió de igual manera, salvo que durante los 20s anteriores a cada descarga se emitía un tono

de 800Hz y 80dB. En ambos casos, durante toda la experiencia se grabó al animal y se analizó la cantidad de tiempo sobre el total que el animal estuvo paralizado como respuesta al miedo.

En el caso del AFC el animal relaciona sobre todo el sonido con la descarga inmediata, con lo que la mera reproducción dará lugar a una respuesta de miedo. En el caso del CFC el animal no prevé la descarga, así el condicionamiento se centra en el contexto físico en que se encuentra.

Tras 24 horas se analizó la capacidad para recordar el evento traumático del condicionamiento. Para ello se colocaron los animales en el mismo cubículo durante 6 minutos y se midió la cantidad de tiempo que el animal se paralizaba por el recuerdo del contexto en el caso del CFC, o del tono en el caso de AFC. El tercer y último día, a modo de control, se registró la respuesta al miedo en los mismos animales en un contexto totalmente diferente sin ningún tono ni descarga para comprobar que en el condicionamiento no se había generado una aversión indiscriminada.

Los resultados muestran que los animales inyectados con PTD4-PI3KAc presentan una mayor memoria asociativa 24 horas después del condicionamiento como consecuencia del tratamiento para el CFC. En el caso del AFC, donde la respuesta frente al miedo es independiente de hipocampo, no se observó una diferencia significativa en la respuesta al miedo antes ni después de emitirse el tono del condicionamiento. Esto muestra que el efecto sinaptogénico es específico de hipocampo y coincide con los cambios estructurales encontrados tanto *in vitro* como *in vivo*.

2.5. Estudio de la morfología de espinas

Un paso más en la profundización del estudio ha consistido en el análisis de los cambios en la morfología de las espinas. En este estudio se distinguieron los siguientes grupos experimentales: ratas controles y tratamientos tras 96 horas de inyección del péptido y que han pasado el test de comportamiento CFC, y ratas controles y tratamientos naive tras 96 horas de administración del péptido (estos animales naive no han pasado el CFC; pero corresponden a la misma cohorte experimental que los animales que sí han pasado el test). Los datos obtenidos se compararon con los correspondientes animales tras 72 horas de la inyección del péptido.

Los resultados indican que transcurridas 96 horas, los animales naive tratados con PTD4-PI3KAc, mantienen una densidad de espinas un 13% superior a los controles. El test de comportamiento CFC por sí mismo, produce un aumento del 30% en la densidad de espinas; enmascarando el efecto producido por la administración del péptido (Enríquez-Barreto *et al.*, en preparación).

A nivel morfológico, el estudio ha revelado que el aprendizaje tiene un efecto sobre el tamaño de las espinas, ya que modifica el tamaño de las mismas con una clara tendencia hacia la formación de espinas con áreas de cabezas mayores (fig. 7). Así mismo, nos ha permitido evaluar la evolución temporal de la morfología de las espinas desvelando que la sobreactivación

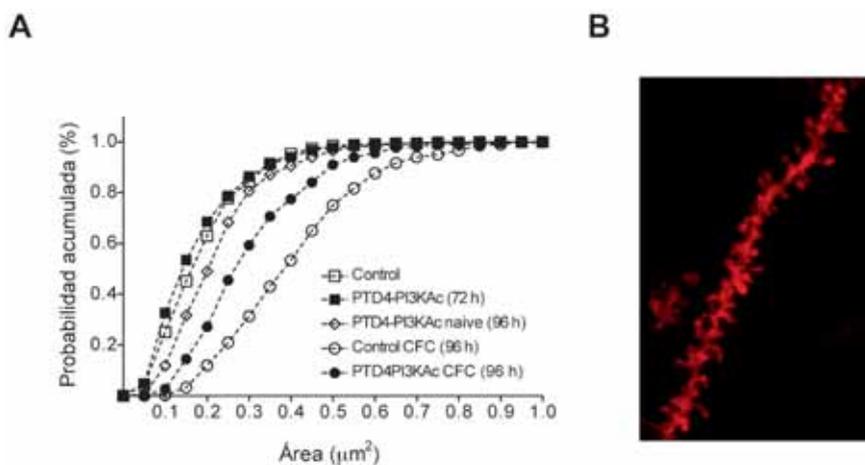


Figura 7. El panel de la derecha muestra la gráfica de probabilidad acumulada relativa a las áreas de las cabezas de las espinas en los casos analizados. Nótese que el CFC, *per se*, aumenta el tamaño de las espinas, dando lugar a cabezas con áreas mayores. Sin embargo, los animales tratados con PTD4-PI3KAc, incluso después del test de aprendizaje, muestran áreas más pequeñas que los correspondientes controles. El panel de la izquierda muestra las espinas dendríticas en un segmento de dendrita basal de una neurona piramidal del hipocampo de rata. La neurona ha sido marcada con el colorante lipofílico DiI utilizando la técnica del “gene gun”.

de PI3K favorece principalmente la formación de espinas pequeñas, dato que podría estar en consonancia con las observaciones de que esta sobreactivación también facilita el aprendizaje (Enríquez-Barreto *et al.*, en preparación).

2.6. SynapCountJ

Como se ha descrito en apartados anteriores, el Laboratorio de Plasticidad Sináptica Estructural estudia la complejidad neuronal y la densidad de los contactos sinápticos en neuronas *in vitro* e *in vivo*. Estos análisis se han estado haciendo de manera rutinaria en el laboratorio de forma manual mediante procedimientos que implican un cierto grado de criterios subjetivos, además de ser complicados y de requerir mucho tiempo de trabajo. Por ello ha surgido la necesidad de desarrollar un método objetivo y eficaz que permita llevar a cabo estos análisis.

En colaboración con el grupo del Dr. Julio Rubio perteneciente al Departamento de Matemáticas y Computación de la Universidad de La Rioja, se ha desarrollado un plug-in para ImageJ (software libre especializado en el procesamiento de imágenes biomédicas; NIH, Bethesda, USA) denominado SynapCountJ. Su objetivo consiste en identificar y cuantificar la densidad sináptica a partir de imágenes de inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo en cultivo. Los algoritmos subyacentes a este programa están basados en técnicas homológicas para el procesamiento de imágenes digitales. Con este sistema se intentan resolver problemas como el marcaje impreciso o la

eliminación de ruido de la imagen. Asimismo, a la hora de analizar este tipo de imágenes, se unifican criterios que permiten trabajar de una manera más rápida. Como se ha indicado inicialmente, la identificación y el conteo de las sinapsis se realiza de manera manual; el empleo de SynapCountJ reduce el tiempo de espera de obtención de los resultados de 15 minutos por imagen a 30 segundos.

Para los próximos dos años el laboratorio se ha embarcado en el desarrollo de un nuevo programa que facilite el conteo y la clasificación de espinas de una neurona, tanto en cultivo como en rodajas de hipocampo. Para ello se utilizarán técnicas que se basan en los criterios de la homología persistente. De esta manera pretendemos objetivizar los criterios de identificación de un contacto sináptico y dar una solución automatizada que nos permita trabajar a gran escala (Heras *et al.*, en preparación).

3. PI3K Y SU IMPLICACIÓN EN DIVERSAS ENFERMEDADES: POTENCIAL PAPEL TERAPÉUTICO DEL PÉPTIDO PTD4-PI3Kac.

3.1. Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más abundante de demencia en los países industrializados. Es una enfermedad degenerativa progresiva del cerebro, caracterizada por la desorientación, la pérdida de memoria, de atención y de la capacidad de raciocinio. Esta enfermedad finalmente causará la muerte tras un largo proceso de degeneración en el que el paciente pierde todas sus capacidades físicas y psíquicas.

Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida de la capacidad cognitiva, la atrofia cerebral debida a la pérdida de neuronas y sinapsis, y la formación de lesiones patológicas; placas amiloides extracelulares (compuestas de péptido beta amiloide insoluble) y ovillos neurofibrilares (agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada) (Goedert y Spillantini, 2006). A lo largo de los años se han propuesto diferentes teorías que explican el deterioro cognitivo asociado a esta enfermedad. La más aceptable es la hipótesis β -amiloide. Esta hipótesis sugiere un procesamiento anormal de la proteína APP (amyloid precursor protein), mediante el cual se generan pequeños fragmentos de péptido β -amiloide insoluble, que se acumulan formando depósitos, siendo éstos los responsables de la pérdida de actividad y muerte neuronal. En los últimos años diversos autores han demostrado que la pérdida de función sináptica es anterior a la formación de las placas amiloideas, siendo los oligómeros solubles del péptido amiloide, en lugar de los insolubles, los responsables de la demencia (Selkoe, 2002). En los enfermos de Alzheimer, existe una pérdida de la densidad de espinas y de contactos sinápticos en la zona del hipocampo y la corteza frontal, principales áreas afectadas en esta patología (DeKosky y Scheff, 1990; Walsh y Selkoe, 2004). Esta pérdida sináptica presenta una mayor correlación con el deterioro cognitivo que las placas neurofibrilares o la pérdida neuronal (Fiala *et al.*, 2002). Por lo tanto, una

terapia capaz de prevenir o restaurar las pérdidas sinápticas, y en concreto de espinas dendríticas, podría contrarrestar los síntomas de la enfermedad.

Con el fin de estudiar los mecanismos implicados en la pérdida cognitiva asociada a la EA y diseñar posibles terapias que reviertan los síntomas, existen modelos murinos como el ratón transgénico Tg2576. Estos animales contienen una doble mutación en el gen APP, que origina una disminución en la densidad de espinas del 18 % a los 4 meses y del 27 % a los 12 meses, déficit que correlaciona con una pérdida en la capacidad de aprendizaje de estos animales medida con el CFC (contextual fear conditioning) (Jacobsen *et al.*, 2006).

Basándonos en la hipótesis de que una activación controlada de la vía PI3K puede servir para aumentar el número de espinas dendríticas y así contrarrestar la pérdida sináptica observada en la enfermedad de Alzheimer, nuestro objetivo consiste en estudiar el efecto del péptido PTD4-PI3KAc sobre las capacidades cognitivas en el modelo murino Tg2576.

En primer lugar se analizará la capacidad espinogénica del péptido mediante marcaje neuronal y posterior conteo de espinas a lo largo de las dendritas basales primarias de neuronas piramidales de la región de CA1 del hipocampo (fig. 8), zona íntimamente relacionada con la memoria y el aprendizaje, y donde se observan déficits sinápticos y pérdida de espinas en enfermos de Alzheimer y en animales modelo de AD (Knafo *et al.*, 2009). En segundo lugar, se determinará si un aumento de la densidad de espinas en este modelo, es capaz de revertir la pérdida cognitiva. Para analizar la capacidad cognitiva hipocámpal se someterá a los animales al test de condicionamiento por miedo (CFC) analizando el tiempo que permanecen inmóviles en respuesta a un estímulo aversivo controlado, siendo éste un indicativo de la capacidad de aprendizaje del animal.

Experimentos previos realizados en el laboratorio empleando ratas (*rattus norvegicus*), demuestran la capacidad del péptido activador de PI3K para aumentar el número de espinas y la capacidad de aprendizaje (Cuesto *et al.*, 2011), lo que induce a pensar que estos efectos también podrían darse en animales modelo de la enfermedad de Alzheimer. La demostración de los efectos restauradores nos permitirá proponer una nueva terapia para el tratamiento de esta enfermedad.

3.2. Glaucoma

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa ocular asintomática. Cuando no se trata adecuadamente puede llegar a causar ceguera, de hecho es la primera causa de ceguera no traumática. Existen diferentes tipos de glaucoma, y también hay diversas formas de clasificarlos: en función de la edad a la que aparece, de su origen o de la amplitud del ángulo iridocorneal. Entre los tipos más frecuentes están: glaucoma agudo, crónico simple, crónico de ángulo estrecho y congénito.

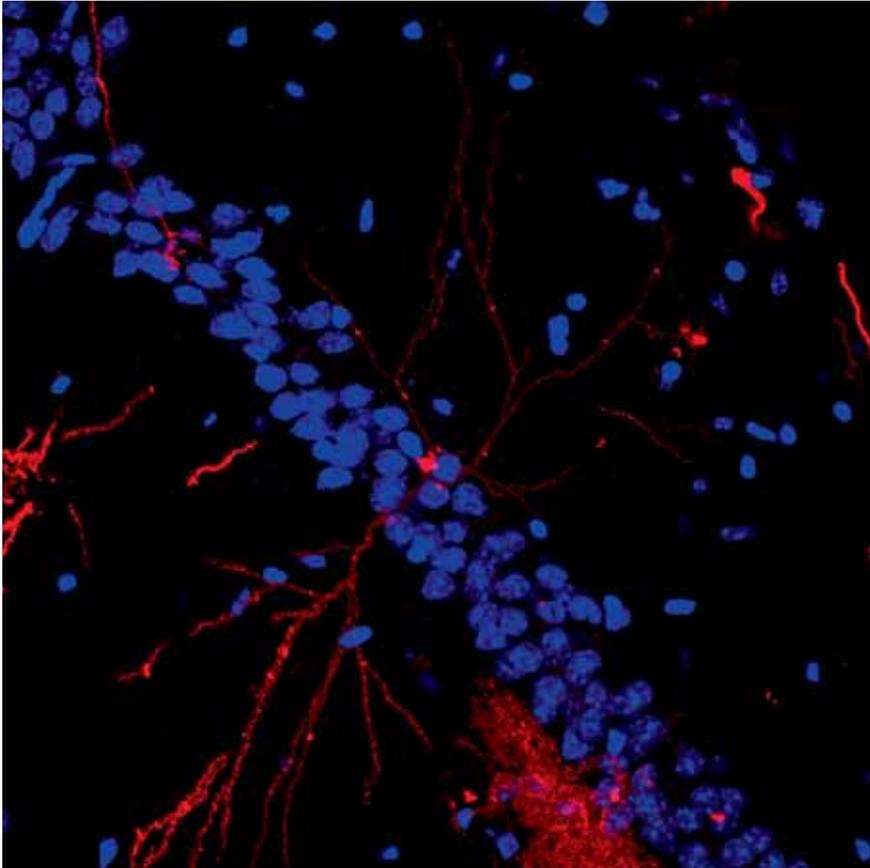


Figura 8. Neurona piramidal de la región CA1 del hipocampo teñida con DiI mediante la técnica del "gene gun". Esta técnica consiste en el disparo de partículas de tungsteno de 1,7 μm de diámetro recubiertas del colorante (DiI) sobre una rodaja de cerebro de 200 μm de espesor previamente fijada. El colorante se une a la membrana celular y difunde por ella proporcionando un marcaje completo de la estructura celular. La imagen muestra la proyección máxima de un stack de imágenes tomadas con el microscopio confocal leica SP5 con objetivo de 63X.

Generalmente, el primer síntoma del glaucoma es la pérdida de la visión periférica. La ceguera que provoca es consecuencia de una muerte progresiva de las neuronas ganglionares de la retina. La etiología de esta enfermedad es multifactorial pero el principal factor de riesgo es un aumento de la presión intraocular provocado por la disminución de la capacidad de evacuar el humor acuoso.

Aunque casi todos los tipos de glaucoma cursan con este aumento de presión, también se da la enfermedad en ojos normotensos, por tanto las razones que inducen la muerte neuronal, no se pueden explicar únicamente por el aumento de presión.

El tratamiento común es la terapia baroprotectora, pero dado el carácter neurodegenerativo de la enfermedad es necesario encontrar un fármaco con efectos neuroprotectores.

3.2.1. *Potencial neuroprotector de la vía de PI3K*

Como se ha explicado previamente, la señalización PI3K/Akt se inicia a través del reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática. A través de la fosforilación de diversas dianas intracelulares, la activación de Akt controla eventos que conducen a un incremento de la supervivencia celular, la proliferación, el crecimiento y el metabolismo (fig. 1) La activación de Akt tiene efecto antiapoptótico, ya que por un lado provoca aumento en la expresión de Bcl-2, una proteína antiapoptótica, y por otro lado, fosforila BAD, impidiendo su interacción con otras proteínas proapoptóticas como Bax y Bak que así no pueden formar el heterodímero que se requiere para abrir los poros de transición mitocondrial PT y permitir la salida al citoplasma del citocromo c y otros activadores de caspasas. Además, Akt directamente provoca la inhibición de las caspasas impidiendo que se forme el complejo pro-caspasa 9 y el inicio de la cascada de activación de la ruta apoptótica de la caspasa-3.

Como se ha descrito, en el laboratorio se emplea un péptido, PTD4-PI3KAc, con actividad biológica sobre la vía de Akt. Dado el potencial antiapoptótico de la activación de Akt, se ha iniciado una línea de investigación basada en la prevención del glaucoma a través del efecto neuroprotector. Para que sea viable el uso del péptido como fármaco en el tratamiento del glaucoma, es indispensable entre otros requisitos, revertir el proceso de neurotoxicidad y segundo encontrar una vía válida para introducir el péptido en el ojo humano.

La neurotoxicidad se está estudiando en un modelo murino de cultivos primarios de neuronas, expuestos a un agente neurotóxico (NMDA). Los primeros resultados muestran que la adición de 50 µg/ml de PTD4-PI3KAc revierte el proceso de muerte por la activación excesiva de NMDA (fig. 9). Para poder demostrar que el péptido atraviesa la córnea usaremos modelos animales a los que aplicaremos el péptido marcado con un fluoróforo. El posterior procesamiento del tejido nos permitirá estudiar la localización intraocular y las concentraciones alcanzadas.

3.3. ELA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (ALS en inglés, Amyotrophic Lateral Sclerosis, enfermedad de Charcot, MND o enfermedad de Lou Gehrig; OMIM #105400) es un grupo de enfermedades neurodegenerativas mortales caracterizadas por la pérdida de motoneuronas superiores del córtex motor e inferiores del tronco cerebral, la espina dorsal y los tractos asociados. Clínicamente se manifiesta por la aparición de atrofia y debilidad muscular progresiva, fatiga excesiva, fasciculaciones generalizadas, espasticidad y otros signos de disfunción del tracto piramidal como disartria, disfgia y dis-

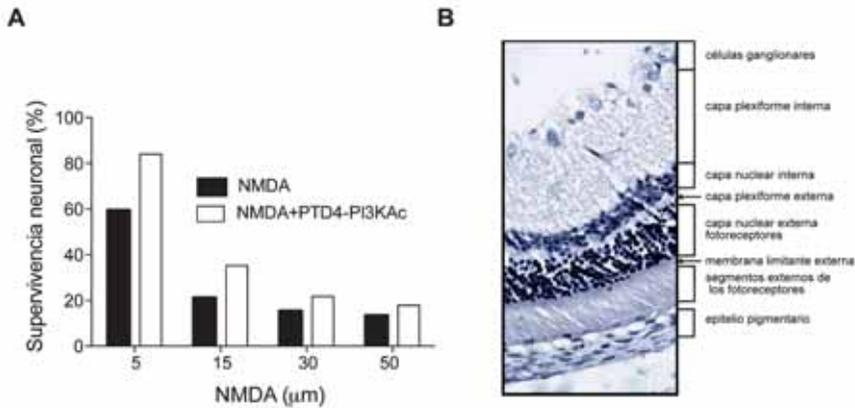


Figura 9. **A.** Gráfica representativa de experimentos de excitotoxicidad en neuronas utilizando distintas concentraciones de NMDA como inductor de apoptosis. Las barras negras muestran los porcentajes de muerte celular en presencia de NMDA y las barras blancas el rescate de la supervivencia tras la adición del péptido PTD4-PI3KAc (50 µg/ml). **B.** Corte histológico del fondo de ojo de ratón teñido con Hematoxilina-Eosina. Foto tomada con un objetivo 40x en microscopio óptico DM6000B de Leica. En la foto se pueden observar las diferentes capas que componen la retina del ojo.

nea. La muerte se produce por fallo respiratorio debido a la parálisis progresiva por lo que la respiración asistida prolonga la supervivencia (Rowland y Schneider, 2001).

El ELA, o ALS, es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes del mundo occidental. La ALS esporádica (SALS) es la forma más prevalente y constituye alrededor del 90% de los casos. La forma familiar o FALS, se hereda en un patrón genético dominante y representa el 10% de los casos. La afección es independiente del sexo y de la raza (Hirtz *et al.*, 2007). Hombres y personas mayores tienen mayor predisposición a padecer la enfermedad, siendo la edad promedio de la aparición de los síntomas de 55 años y el rango de la enfermedad de 12 a 98 años. El 50% de las muertes se produce antes de los 18 meses posteriores al diagnóstico de la enfermedad, el 20% sobrevive 5 años y el 10% más de 10 años.

En Europa la incidencia (número de individuos sanos que desarrollan la enfermedad en un periodo de tiempo) es de 2 casos por cada 100.000 habitantes y la prevalencia (proporción de individuos de un grupo que presentan una característica o evento determinado en un momento o en un periodo determinado) de 8 cada 100.000 habitantes (Traynor *et al.*, 1999; Rowland y Shneider, 2001; Kiernan *et al.*, 2011).

Hasta la fecha, la etiología de la enfermedad está aún por resolverse. En el ELA se han implicado alrededor de 20 genes con una gran variedad de funciones (Kiernan *et al.*, 2011), correspondiéndose con la mutación más frecuente asociada a la enfermedad la del gen C9ORF72. Este gen, ubicado en

el brazo corto del cromosoma 9, presenta repeticiones del hexanucleótido GGGGCC dentro del primer intrón, entre 0 y 20 repeticiones en individuos sanos, y más de 30 repeticiones en la forma relacionada con la patología de ALS (además de demencia frontotemporal). Entre FALS y SALS esta mutación suma alrededor del 50% de los casos reportados en Finlandia y un tercio de los individuos del resto de Europa (Andersen *et al.*, 2003).

Otro gen de gran trascendencia relacionado con la patología es SOD1. SOD1 codifica para una superóxido dismutasa Cu/Zn y su función es eliminar el anión superóxido, una de las principales especies derivadas de oxígeno responsable del stress oxidativo celular (Forman *et al.*, 2004). Se han identificado más de 50 mutaciones relacionadas con la patología de ALS. Las hipótesis sobre los efectos de estas mutaciones son varias e incluyen excitotoxicidad glutamatérgica, daño oxidativo, defectos en el transporte axonal, así como agregados de proteínas intracelulares (Lagier-Tourenne y Cleveland, 2009). Las mutaciones en SOD1 tipo FALS representan el 20% de los casos familiares, mientras que los tipo SALS alrededor del 5%.

El gen TARDBP o TDP43 que codifica para una proteína de unión a DNA/RNA regula la estabilidad, la transcripción, el corte y empalme alternativo de RNA. Esta proteína es el mayor componente de los agregados encontrado en muchos pacientes de ALS esporádica, así como en muchos pacientes con demencia frontotemporal. En los agregados predomina una forma hiperfosforilada de TDP43 y un fragmento de 25 KDa que ha perdido el dominio de localización nuclear (Lagier-Tourenne y Cleveland, 2009). Las mutaciones tipo FALS representan el 5-10% de los casos, mientras que los SALS menos del 1% del total de casos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5942>).

Recientes estudios vinculan el gen FUS (Fused in Sarcoma o TLS) con la patología del ELA. FUS se encuentra en el cromosoma 16 y codifica una proteína de 526 aminoácidos de longitud cuya función es, por un lado ayudar a la integridad del genoma uniéndose a cadenas simples y dobles de DNA, y por otro, interaccionar con moléculas de RNA favoreciendo su estabilidad especialmente en el transporte del mismo (<http://www.uniprot.org/uniprot/P35637>). FUS presenta en la porción central un dominio de “dedos de Zinc” (dominios cuya función es interaccionar con DNA y RNA) y el extremo carboxilo terminal una región extremadamente conservada. En esta última región se acumulan la mayoría de las mutaciones relacionadas con ELA. Al igual que TDP43, los enfermos de ELA presentan grandes agregados de proteínas en el citoplasma de las neuronas afectadas así como células gliales (Kwiatkowski *et al.*, 2009). Las mutaciones en esta proteína constituyen el 8% del total de las ALS familiares (Lagier-Tourenne y Cleveland, 2009; Syriani *et al.*, 2011).

El gen OPTN (Optineurina), localizado en el brazo pequeño del cromosoma 10, se había relacionado históricamente con el progreso del glaucoma de ángulo abierto; pero un estudio reciente lo relaciona también con la patología de ALS (Maruyama *et al.*, 2010). Las funciones de OPTN son variadas e incluyen morfogénesis celular, tráfico de membranas, activación de la transcripción y regulación negativa de la inducción de NFκB por parte de

virus de RNA. Esta última función es la que se pierde en las formas mutadas que impiden la inhibición de la activación de NFκB, y cambian la distribución citoplasmática de Optineurina (Maruyama *et al.*, 2010). OPTN es responsable del 3,8% de los casos FALS y del 0,29% de los SALS.

ANG (Angiogenina) codifica para una ribonucleasa de 14 KDa de la familia de las RNasa A. Esta proteína actúa en la vía protectora endógena de las motoneuronas expuestas a hipoxia inducida. Los casos de mutaciones en AGN representan el 1% de los FALS (Sebastià *et al.*, 2009).

El Laboratorio de Plasticidad Sináptica Estructural (PSE) tiene una línea de trabajo enfocada en ELA y la identificación de posibles nuevas mutaciones. El grupo ha logrado reunir un extenso banco de DNA con más de 300 muestras relacionadas con ELA y otras neuropatologías en colaboración con el Doctor Josep Gámez i Carbonell (Dpto. Neurología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona). Entre los logros del laboratorio de PSE se encuentran la identificación de la mutación K510E, el primer caso de ALS producido por mutaciones en FUS de España; la identificación de la mutación en SOD1 E22G que predice un mayor tiempo de supervivencia en los afectados así como la identificación de un paciente con el síndrome de Allgrove o Triple A, una rara enfermedad autosómica recesiva con solo 70 casos dados en todo el mundo, producida por una mutación en el gen AAAS que causa insuficiencia adrenal por resistencia a la hormona adrenocorticotropa (Syriani *et al.*, 2009; Syriani *et al.*, 2011; Gámez *et al.*, 2010).

BIBLIOGRAFÍA

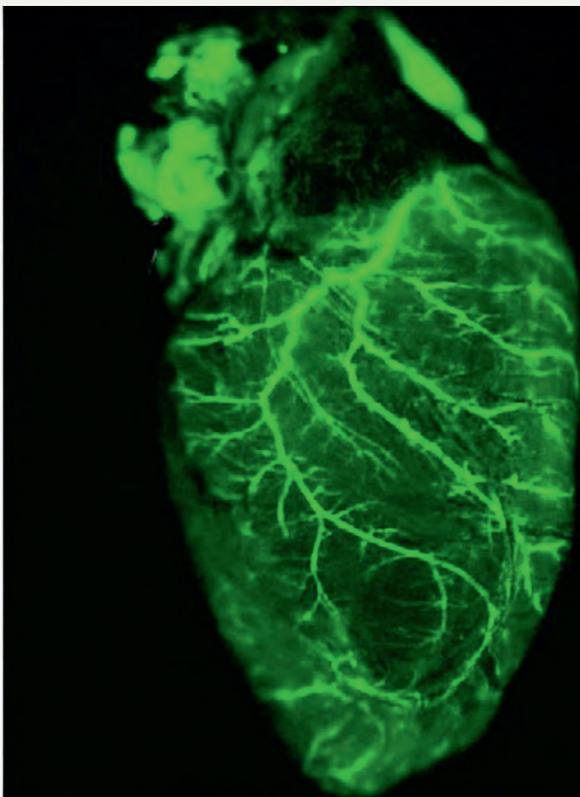
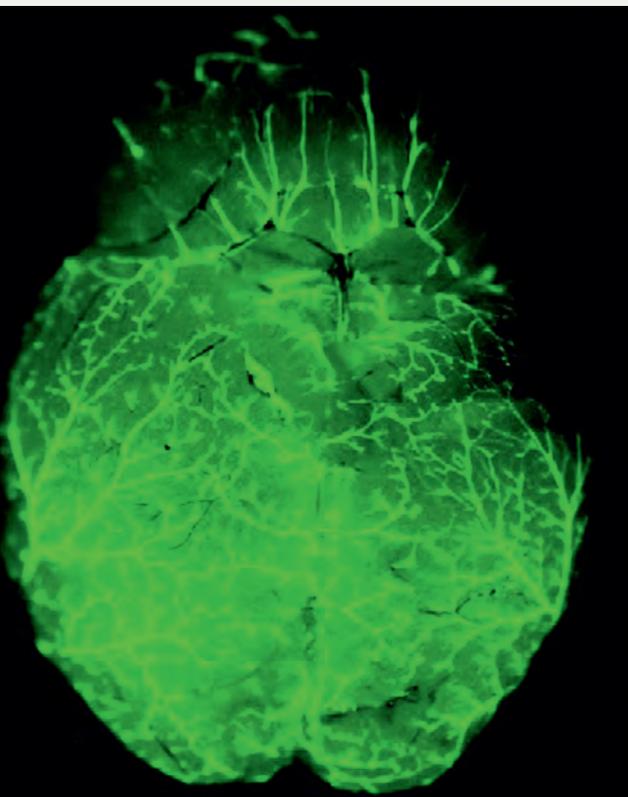
- Acebes, A., Morales, M. (2012) At a PI3K crossroads: lessons from flies and rodents. *Rev Neurosci.* 23(1):29-37.
- Acebes, A., Martín-Peña, A., Chevalier, V., Ferrús, A. (2011) Synapse loss in olfactory local interneurons modifies perception. *J Neurosci.* 31(8): 2734-45.
- Andersen, P., Sims, K., Xin, W., Kiely, R., O'Neill, G., Ravits, J., Pioro, E., Harati, Y., Brower, R. D., Levine, J. S., Heinicke, H. U., Seltzer, W., Boss, M., Brown, R. H. Jr. (2003) Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 4(2): 62-73.
- Arendt, K. L., Royo, M., Fernández-Monreal, M., Knafo, S., Petrok, C. N., Martens, J. R., Esteban, J. A. (2010) PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* 13: 36-44.
- Benson, D. L., Watkins, F. H., Steward, O., Banker, G. (1994) Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *J Neurocytol* 23: 279-295.

- Bourne, J., Harris, K. M. (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol.* (3): 381-6. Review.
- Bradley, W., Doble and James R. Woodgett. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116: 1175-1186.
- Calabrese, B., Wilson, M. S., Halpain, S. (2006) Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology* (Bethesda). 1: 38-47. Review.
- Cuesto, G., Enríquez-Barreto, L., Caramés, C., Cantarero, M., Gasull, X., Sandi, C., Ferrús, A., Acebes, Á., Morales, M. (2011) Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 31(8): 2721-33.
- Cully, M., You, H., Levine, A. J., Mak, T. W. (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs Turing tumorigenesis. *Nature Rev Cancer.* 6(3): 184-92.
- Dekosky, S. T., Scheff, S. W. (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 27, 457-464.
- Derossi, D., Williams, E. J., Green, P. J., Dunican, D. J., Doherty, P. (1998) Stimulation of mitogenesis by a cell-permeable PI 3-kinase binding peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 251(1): 148-52.
- Dunaevsky, A., Tashiro, A., Majewska, A., Mason, C., Yuste, R. (1999) Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(23): 13438-43.
- Fayard, E., Xue, G., Parcellier, A., Bozucic, L., Hemmings, B. A. (2010) Protein kinase B(PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol.* 346: 31-56. Review.
- Fiala, J. C., Spacek, J., Harris, K. M. (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev.* 39(1): 29-54. Review.
- Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2004) Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 10(10): 1055-63. Review.
- Gámez, J., Caponnetto, C., Ferrera, L., Syriani, E., Marini, V., Morales, M., Bordo, D., Pirro, C., Garre, C., Origone, P. (2010) I112M SOD1 mutation causes ALS with rapid progression and reduced penetrance in four Mediterranean families. *Amyotroph Lateral Scler.* 12(1): 70-5.
- Goedert, M., Spillantini, M. G. (2006) A Century of Alzheimer's Disease. *Science* 314, 777.
- Hering, H, Sheng, M. (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci.* (12):880-8. Review.

- Hirtz, D., Thurman, D. J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A. R., Zalutsky, R. (2007) How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology*. (5): 326-37.
- Ho, A., Schwarze, S. R., Mermelstein, S. J., Waksman, G., Dowdy, S. F. (2001) Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res*. 61(2): 474-7.
- Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J. H., Pangalos, M. N., Reinhart, P. H., Bloom, F. E. (2006) Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(13): 5161-6.
- Jaworski, J., Sheng, M. (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and plasticity. *Mol Neurobiol* 34: 205-219.
- Jiang, H, Rao, Y. (2005) Axon formation: fate versus growth. *Nat Neurosci*. 8: 544-546.
- Jordán-Álvarez, S., Fouquet, W., Sigrist, S. J., Acebes, A. (2012) Presynaptic PI3K activity triggers the formation of glutamate receptors at neuromuscular terminals of *Drosophila*. *J Cell Sci*. 125(Pt 15): 3621-9.
- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J. R., Zoing, M. C. (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 377(9769): 942-55. Review.
- Kim, J. J., Fanselow, M. S. (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256: 675-677.
- Knafo, S., Alonso-Nanclares, L., González-Soriano, J., Merino-Serrais, P., Fernaud-Espinosa, I., Ferrer, I., Defelipe, J. (2009) Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer’s disease. *Cereb Cortex*. (3): 586-92.
- Kneussel, M., Betz, H. (2000) Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol* 525: 1-9.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., Seeburg, P. H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269: 1737-1740.
- Kwiatkowski, T. J. Jr., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E. J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G. A., Hosler, B. A., Cortelli, P., De Jong, P. J., Yoshinaga, Y., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P. C., Horvitz, H. R., Landers, J. E., Brown, R. H. Jr. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323(5918): 1205-8.
- Kwon, C. H., Luikart, B. W., Powell, C. M., Zhou, J., Matheny, S. A., Zhang, W., Li, Y., Baker, S. J., Parada, L. F. (2006) Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron*. 50(3): 377-88.

- Lagier-Tourenne, C., Cleveland, D. W. (2009) Rethinking ALS: the FUS about TDP-43. *Cell* 136(6): 1001-4. Review.
- Lin, C. H., Yeh, S. H., Lin, C. H., Lu, K. T., Leu, T. H., Chang, W. C., Gean, P. W. (2001) A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* 31: 841-851.
- López-Fernández, M. A., Montaron, M. F., Varea, E., Rougon, G., Venero, C., Abrous, D. N., Sandi, C. (2007) Upregulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the dorsal hippocampus after contextual fear conditioning is involved in long-term memory formation. *J Neurosci* 27: 4552-4561.
- Martín-Peña, A., Acebes, A., Rodríguez, J. R., Sorribes, S. A., De Polavieja, G. G., Fernández-Fúnez, P., Ferrús, A. (2006) Age-independent synaptogenesis by phosphoinositide 3 kinase. *J Neurosci* 26(40): 10199-208.
- Maruyama, H., Morino, H., Ito, H., Izumi, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Kinoshita, Y., Kamada, M., Nodera, H., Suzuki, H., Komure, O., Matsuura, S., Kobatake, K., Morimoto, N., Abe, K., Suzuki, N., Aoki, M., Kawata, A., Hirai, T., Kato, T., Ogasawara, K., Hirano, A., Takumi, T., Kusaka, H., Hagiwara, K., Kaji, R., Kawakami, H. (2010) Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465(7295): 223-6.
- Osmond, R. I., Crouch, M. F., Dupriez, V. J. (2010) An emerging role for kinase screening in GPCR drug discovery. *Curr Opin Mol Ther*. Review.
- Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., Vanleeuwen, J. E., Woolfrey, K. M. (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 14(3): 285-93. Review.
- Ramón y Cajal, S. (1899) *La Textura del Sistema Nerviosa del Hombre y los Vertebrados*. Madrid, Moya (Primera Edición).
- Rao, A., Kim, E., Sheng, M., Craig, A. M. (1998) Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 18: 1217-1229.
- Rowland, L. P., Shneider, N. A. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344(22): 1688-700. Review.
- Sebastià, J., Kieran, D., Breen, B., King, M. A., Netteland, D. F., Joyce, D., Fitzpatrick, S. F., Taylor, C. T., Prehn, J. H. (2009) Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury. *Cell Death Differ* 16(9): 1238-47.
- Selkoe, D. J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 295(5594): 789-91. Review.
- Syriani, E., Morales, M., Gámez, J. (2011) FUS/TLS gene mutations are the second most frequent cause of familial ALS in the Spanish population. *Amyotroph Lateral Scler* 12(2): 118-23.
- Syriani, E., Morales, M., Gámez, J. (2009) The p.E22G mutation in the Cu/Zn superoxide-dismutase gene predicts a long survival time: clinical and

- genetic characterization of a seven-generation ALS1 Spanish pedigree. *J Neurol Sci.* 285(1-2): 46-53.
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A. C., Sonenberg, N., Schuman, E. M. (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 467-472.
- Traynor, B. J., Codd, M. B., Corr, B., Forde, C., Frost, E., Hardiman, O. (1999) Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997: a population-based study. *Neurology.* 52(3): 504-9.
- Tsokas, P., Grace, E. A., Chan, P., Ma, T., Sealfon, S. C., Iyengar, R., Landau, E. M., Blitzer, R. D. (2005) Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J Neurosci* 25: 5833-5843.
- Walsh, D. M., Selkoe, D. J. (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44, 181-193.
- Wu, H., Yan, Y., Backer, J. M. (2007) Regulation of class IA PI3Ks *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 2): 242-4.
- Wymann, M. P., Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436: 127-150.
- Yoshimura, T., Arimura, N., Kawano, Y., Kawabata, S., Wang, S., Kaibuchi, K. (2006) Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(1): 62-8.
- Yu, J., Zhang, Y., Mcilroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G. A., Backer, J. M. (1998) Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit *Mol Cell Biol.*18(3): 1379-87.
- Ziv, N. E., Garner, C. C. (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci* 5: 385-399.



ZUBÍA

24



Gobierno de La Rioja
www.larioja.org



**Instituto
de Estudios
Riojanos**