

# XXXIII Reunión Anual del Grupo Español de Neurotransmisión y Neuroprotección (GENN XXXIII)

Oñate, Guipúzcoa, 12-15 de diciembre de 2012

## COMUNICACIONES ORALES

### Sesión 1. Canales iónicos, receptores, transportadores y transducción de señales

#### 01.

#### Bloqueo del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial por nuevos derivados de benzotiacepina

F.J. Martínez-Sanz<sup>a</sup>, A.J. Moreno-Ortega<sup>b</sup>, M. Guerra<sup>b</sup>, M. Villarroya<sup>a</sup>, C. de los Ríos<sup>b</sup>, M.F. Cano-Abad<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>b</sup>Fundación de Investigaciones Biomédicas. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Hospital Universitario La Princesa. Madrid.

Una alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  puede derivar en diversos procesos fisiopatológicos, teniendo en cuenta la implicación de este ión en innumerables rutas metabólicas. De ahí que se necesite una fina regulación de sus niveles intracelulares. Una de las nuevas estrategias para modular los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  es mediante la intervención farmacológica sobre el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (INCM), efectuado por una familia de 4,1-benzotiacepinas, que tiene por cabeza de serie el CGP37157. Estos derivados provocan la retención más prolongada de  $\text{Ca}^{2+}$  en esta organela, ayudando a que en el citosol no se alcancen concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citotóxicas. En nuestro laboratorio, he-

mos llevado a cabo la síntesis de nuevos análogos de CGP37157 en base a un diseño por isómeros con el objetivo de mejorar el bloqueo del INCM y aportar un mayor perfil citoprotector. Presentamos los protocolos que hemos puesto a punto para evaluar su capacidad bloqueante del INCM, mediante pulsos de histamina. Los fármacos sintetizados se han evaluado en mitocondrias *in situ*, en células HeLa permeabilizadas y transfectadas con la proteína eucarina genéticamente dirigida a la matriz mitocondrial (AEQ-Mt-mut). De los parámetros cinéticos que obtuvimos de este primer cribado, se eligió el compuesto que mejor respuesta dio a este estímulo reduciendo de forma significativa la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria. El compuesto elegido, ITH12575, se estudió en mitocondrias *in situ* con diferentes soluciones para poder evaluar directamente el funcionamiento del INCM y el efecto bloqueante de nuestro compuesto. El compuesto ITH12575 bloqueó el INCM con una CE50 de 0,69  $\mu\text{M}$ , siendo la CE50 del cabeza de serie, CGP37157, de 1,6  $\mu\text{M}$ . La medida de la constante de aclaramiento mitocondrial en estas condiciones revela la potencia del ITH12575 a la hora de bloquear el INCM; en próximos experimentos podremos correlacionar la actividad bloqueante del INCM con el efecto citoprotector encontrado.

#### 02.

#### El condroitín sulfato evoca corrientes de entrada, despolarización y transientes de calcio mediados por receptores de AMPA y kainato en neuronas de hipocampo de rata

M. Maroto-Pérez<sup>a</sup>, J.C. Fernández-Morales<sup>a</sup>, J.F. Padín-Nogueira<sup>a</sup>, E. Albiñana-Durá<sup>a</sup>, J.C. González<sup>a</sup>, J.M. Hernández-Guijo<sup>a</sup>, E. Montell<sup>b</sup>, J. Vergés<sup>b</sup>, A.M. García de Diego<sup>a</sup>, A. García-García<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. <sup>b</sup>Bioibérica SA. Barcelona.

La matriz extracelular en el sistema nervioso central (SNC) está formada por proteínas y glucosaminoglicanos (GAG), macromoléculas que se ensamblan formando una red tridimensional que desempeña un papel fundamental en el desarrollo, regeneración y plasticidad en el SNC. El condroitín sulfato (CS) es un componente ubicuo de la membrana celular y la matriz extracelular; además, es la molécula más abundante de la red perineural, una estructura reticulada que envuelve los cuerpos y dendritas proximales de ciertas subpoblaciones de neuronas. En el SNC, el CS es sintetizado por neuronas y glía en forma de proteoglicanos de CS (PGCS). Se realizaron medidas de potencial de membrana y de corrientes mediante la técnica de *patch-clamp*; además, se midieron las señales citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  por fluorescencia; todo ello en cultivos primarios de células hipocámpales de embrión de rata. Hemos encontrado que el CS es capaz de inducir una corriente de entrada (fundamentalmente de cationes de  $\text{Na}^+$ ) que genera una despolarización en la célula e, incluso, el disparo de potenciales de acción. Además, la perfusión de CS sobre células hipocámpales produjo el esperado transiente de calcio. Todos estos efectos fueron bloqueados

en gran parte por los bloqueantes inespecíficos de AMPA/kainato (CNQX o NBQX) y, en menor parte, por el antagonista AMPA-selectivo GYKY53655. Sin embargo, no hemos observado implicación del subtipo NMDA en estos efectos. El efecto resultó ser específico para este GAG, ya que ni el ácido hialurónico ni la heparina fueron capaces de producir los efectos del CS. Describimos por primera vez el efecto de este GAG sobre la neurotransmisión glutamatérgica. Además, hemos descubierto un efecto directo del CS sobre los receptores AMPA/kainato que son de vital importancia para regular la neurotransmisión en el hipocampo, implicados también en los fenómenos de potenciación y depresión a largo plazo. Este hallazgo añade una diana más a las hasta ahora descritas para el CS, y podría explicar algunas de las funciones descritas para el CS en el SNC; por ejemplo, el tratamiento con enzimas que liberan el CS del núcleo proteico del PGCS restablece la conectividad y plasticidad de neuronas inmersas en el tejido cicatricial.

#### 03.

#### El factor de transcripción Nrf2 como nueva diana terapéutica para la enfermedad de Parkinson

A. Cuadrado-Pastor

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

El daño oxidativo e inflamatorio, la exposición a toxinas ambientales y la agregación de proteínas son las señas de identidad de la enfermedad de Parkinson (EP) esporádica y familiar. Todos estos acontecimientos pueden

ser apagados mediante la regulación de la actividad del factor de transcripción Nrf2. Esta proteína ha surgido en los últimos años como un factor crítico para mantener la homeostasis del tejido y para prevenir la progresión de la enfermedad en varios modelos animales de EP. Por ejemplo, los ratones deficientes en Nrf2 exhibieron una degeneración nigroestriatal y una neuroinflamación exacerbadas en respuesta a la inoculación crónica de la toxina parkinsoniana metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y en un modelo de sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína basado en la administración estereotáctica en el mesencéfalo ventral de un vector viral adenoasociado. Aunque la actividad de Nrf2 disminuye con la edad, que es el principal factor de riesgo para la EP, su función puede ser restaurada por medios farmacológicos. La administración intraperitoneal del potente activador sulforafano (SFN) aumenta los niveles de proteína Nrf2 en los ganglios basales y produce la sobreexpresión de sus genes diana, tales como hemo oxigenasa-1 (HO-1) y NAD (P) H quinona oxidoreductasa (NQO1). En ratones de tipo salvaje, pero no en ratones deficientes en Nrf2, el SFN protege frente a la muerte inducida por MPTP de neuronas dopaminérgicas nigrales. Los efectos neuroprotectores se acompañan de una disminución en la astrogliosis y en la microgliosis, y de una menor liberación de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, el principal inconveniente de la terapia con levodopa —el tratamiento principal para el control de las alteraciones del movimiento en pacientes con EP— es el desarrollo a largo plazo de los movimientos involuntarios denominados discinesias. Estos movimientos se relacionan con la señalización anormal de la dopamina en los ganglios basales. Hemos observado que la señalización por dopamina a través del receptor D1 se intensifica en las neuronas espinosas mediales del estriado de ratones deficientes en Nrf2, y que SFN modula la señalización de la dopamina y reduce los movimientos involuntarios anormales en un modelo de ratón discinético. Estos estudios proporcionan una fuerte evidencia para considerar a Nrf2 como tratamiento adyuvante en la EP.

#### 04.

##### Regulación de la señalización de dopamina por el factor de transcripción Nrf2. Implicaciones en la terapia antidiscinética

A.I. Rojo-Sanchís<sup>a,c</sup>, J.C. Tobón-Velasco<sup>b</sup>, J. Egea<sup>d,e</sup>, M. García-López<sup>d,e</sup>, A. Cuadrado-Pastor<sup>a,b,e</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). <sup>b</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>c</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. <sup>d</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>e</sup>Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Actualmente, la administración crónica de 3,4-hidroxifenil-L-alanina (levodopa) es el tratamiento más eficaz para reemplazar la pérdida de dopamina que acontece en la enfermedad de Parkinson (EP). Sin embargo, la llegada discontinua de dopamina (efecto *on-off*) provoca fluctuaciones en los sistemas nerviosos periférico y central que, sumado al progreso de la enfermedad, causa la aparición de unos movimientos involuntarios conocidos como discinesias. Aunque dichos efectos secundarios están ampliamente caracterizados desde el punto de vista farmacológico, los mecanismos moleculares implicados están todavía sometidos a debate. Considerando que la generación de especies reactivas de oxígeno está estrechamente ligada con el desarrollo de la EP, analizamos la relevancia del estrés oxidativo en la señalización regulada por levodopa empleando ratones deficientes para el factor de transcripción Nrf2, considerado el regulador maestro de la respuesta antioxidante celular. Ratones silvestres o nulos para Nrf2 fueron tratados durante dos semanas con una dosis diaria de levodopa (30 mg/kg intraperitoneal) combinada con benseracida (12 mg/kg intraperitoneal). De acuerdo con la bibliografía, el tratamiento con levodopa incrementó la

actividad de la ruta canónica de señalización por dopamina que incluye DARPP-32 y ERK1/2 en los homogenizados estriales. Los ratones nulos para Nrf2 presentaron niveles más elevados de fosfo-Thr34-DARPP-32 y de fosfo-ERK1/2 que los ratones silvestres, mientras que los niveles totales del receptor de dopamina D1 fueron similares, es decir, la sobreactivación de la vía por la deficiencia en Nrf2 es independiente de los niveles de receptor. Como abordaje alternativo, analizamos los mismos marcadores en un modelo agudo tratando ratones silvestres o nulos para Nrf2 con una única dosis de levodopa (30 mg/kg intraperitoneal). De acuerdo con los resultados del modelo crónico, los ratones deficientes evidenciaron una activación superior de fosfo-Thr34-DARPP-32 y fosfo-ERK1/2 en respuesta a levodopa aguda que sus controles silvestres. Para profundizar en el análisis del papel de Nrf2 empleamos un modelo de rodajas de estriado de 200 micras de grosor. Las secciones estriales procedentes de ratones deficientes en Nrf2 o de sus controles silvestres se trataron durante diferentes tiempos con levodopa, dopamina o el neurotransmisor control glutamato. El análisis temporal de fosfo-Thr34-DARPP-32 y fosfo-ERK1/2 en respuesta a los tres compuestos empleados evidenció que los ratones nulos para Nrf2 presentaban una activación más prolongada, sugiriendo un desequilibrio en la actividad de las cinasas o de las fosfatasa. Todos estos resultados sugieren un papel relevante de Nrf2 como mediador de la señalización por levodopa. Este estudio apunta que Nrf2 podría ser una nueva diana terapéutica para modular el efecto discinético provocado por el tratamiento con levodopa.

#### 05.

##### Relevancia funcional del eje GSK3/Nrf2 en el control de la homeostasis redox en hipocampo

P. Rada-Llano, N.G. Innamorato, J.C. Tobón-Velasco, A. Cuadrado-Pastor, A.I. Rojo-Sanchís

Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Madrid.

Los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo se encuentran gobernados por un sistema antioxidante que está controlado por el factor de transcripción Nrf2. Los niveles de Nrf2 están estrechamente regulados a través de dos mecanismos de degradación mediados por dos adaptadores ubiquitina E3 ligasa denominados Keap1 y  $\beta$ -TrCP. La regulación de Nrf2 por Keap1 supone su degradación sensible a estrés oxidativo. Sin embargo, la degradación de Nrf2 mediada por  $\beta$ -TrCP es dependiente de su fosforilación por GSK3. Nrf2 es fosforilado por GSK3 y, entonces, es reconocido por  $\beta$ -TrCP, que lo marca para su degradación dependiente del proteasoma. Mientras que la regulación de Nrf2 por Keap1 está ampliamente descrita *in vivo* en diferentes contextos fisiopatológicos, la relevancia funcional de este segundo mecanismo dependiente del eje GSK3/ $\beta$ -TrCP no se ha descrito hasta este momento. El efecto de GSK3 en la actividad de Nrf2 *in vivo* se analizó mediante la inyección intraperitoneal de un inhibidor de GSK3, SB216763, y mediante el uso de ratones con una depleción condicional de GSK3 $\beta$  en neuronas de hipocampo. La reducción de los niveles de GSK3 en el hipocampo dio lugar a un incremento en la estabilidad de Nrf2, mientras que los niveles de Keap1 y  $\beta$ -TrCP no variaron. Además, este aumento de Nrf2 correlacionó con un incremento de la expresión de los genes que son controlados por este factor. Finalmente, las neuronas de hipocampo de ratones con una depleción condicional de GSK3 $\beta$  exhibieron niveles elevados de glutatión (GSH) y niveles reducidos de malondialdehído y proteínas carboniladas. En conjunto, estos resultados demuestran que la interrupción del eje GSK3/ $\beta$ -TrCP a nivel de GSK3 provoca un aumento de Nrf2 y de sus genes diana *in vivo*, incrementando la capacidad antioxidante celular. Este estudio sugiere un nuevo mecanismo de regulación de Nrf2 a través de GSK3 y proporciona una nueva estrategia de neuroprotección basada en la utilización de fármacos.

macos que modulan la actividad de esta cinasa en el cerebro.

## 06.

### Señales de importe y exporte nucleares controlan la localización subcelular de Nurr1 en respuesta al estrés oxidativo

A.J. García-Yagüe, P. Rada-Llano, A.I. Rojo-Sanchís, I. Lastres-Becker, A. Cuadrado-Pastor

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Los receptores nucleares comprenden una gran variedad de factores de transcripción como, por ejemplo, los receptores de esteroides o receptores de hormonas. Nurr1 pertenece a una subfamilia de receptores nucleares denominados 'huérfanos' porque la zona de unión a su ligando está bloqueado por voluminosos aminoácidos hidrofóbicos. Otros dos miembros de esta familia son Nur77 y Nor-1. Nurr1 se encuentra predominantemente distribuido por el sistema nervioso central y participa en la adquisición y mantenimiento del fenotipo dopaminérgico. Controla el metabolismo de la dopamina a través de la regulación de genes como la tirosina hidroxilasa, el transportador de dopamina, etc. La pérdida o las alteraciones de este gen se han relacionado con la enfermedad de Parkinson y otros trastornos psiquiátricos. Aunque su función está bien descrita, un aspecto importante y poco conocido es el relacionado con su regulación. Algunos mecanismos de regulación descritos para Nurr1 se centran en el control de su actividad transcripcional o bien en su estabilidad. En estos últimos años, varios trabajos proponen un nuevo mecanismo de regulación de Nurr1, basado en el control de su localización subcelular. A su vez, se ha caracterizado el control de la localización subcelular que sufre otro miembro de esta familia, como es Nur77, a través de mecanismos que implican heterodimerización y estrés oxidativo. Con estos conocimientos, decidimos estudiar si el tráfico subcelular podría considerarse co-

mo un nuevo componente en la regulación de este factor de transcripción. Así, en este estudio, caracterizamos en la secuencia primaria de Nurr1, la presencia de una señal de localización nuclear bipartita (NLS) dentro del dominio de unión a ADN y dos señales de exporte nuclear (NES) en el dominio de unión a ligando, que regulan el tráfico subcelular de Nurr1. Mediante mutagénesis dirigida, analizamos la función de dichas señales en el control de la salida y entrada de Nurr1 en el núcleo. Los ensayos de inmunofluorescencia e inmunotransferencia revelaron que Nurr1 es principalmente nuclear, mientras que mutaciones en la señal bipartita NLS provocan la acumulación de Nurr1 en la fracción citosólica y la disminución de la expresión del reportero de NBRE-Luc. La fusión de estas señales NLS a la proteína verde fluorescente (EGFP) reveló que la secuencia NLS2 induce la acumulación nuclear de la proteína quimérica, indicando que esta secuencia es suficiente para localizar a Nurr1 en el núcleo. Por otro lado, la mutagénesis de las señales NES produjeron la inhibición del exporte de Nurr1 mediado por la forma activa de la exportina-1 (CRM1) y provocando su acumulación en la fracción nuclear. La fusión individual de estas señales NES a la proteína verde fluorescente reveló que ambas inducen el exporte de EGFP a la fracción citosólica en presencia de la exportina CRM1, demostrando que estas secuencias son necesarias y suficientes para inducir el exporte nuclear de Nurr1. El estrés oxidativo es un componente muy importante en diversas patologías, entre ellas su participación en enfermedades neurodegenerativas. Recientemente, se ha descrito que la excitotoxicidad por glutamato provoca el exporte de estos receptores nucleares, entre ellos Nurr1. Por tanto, nos propusimos determinar si la localización subcelular de Nurr1 es susceptible por arsenito sódico, un inductor clásico de estrés oxidativo y mitocondrial. Mediante fraccionamientos subcelulares en células dopaminérgicas MN9D se observó que los niveles nucleares de Nurr1 disminuyen en presencia de arsenito sódico tras 30, 60 y 90 min de tratamiento, correspondiéndose con un leve incremento

de la proteína en la fracción citosólica, mientras que el uso previo de leptomomicina B, un inhibidor de la exportina CRM1, mantuvo constantes los niveles de proteína nuclear, lo que indica que el exporte de Nurr1 está regulado por estrés oxidativo. Esta disminución de los niveles de Nurr1 nucleares se acompañó de una disminución de la expresión de genes regulados por Nurr1, como son la tirosina hidroxilasa, el transportador vesicular 2 de monoaminas y la L-aminoácido aromático descarboxilasa, cercano a un 50% a partir de tres horas de tratamiento con arsenito sódico. Para conocer el mecanismo que induce el exporte de Nurr1 por arsenito sódico, realizamos fraccionamientos subcelulares e inmunofluorescencias en células HEK293T transfectadas con los mutantes en el exporte de Nurr1. Observamos que el mutante en la señal NES2\* es insensible al cambio de localización subcelular, mientras que, con la versión salvaje de Nurr1, existe un aumento de la cantidad de proteína en la fracción citosólica, acompañado de una caída de los niveles en la fracción nuclear a partir de los 30 min de tratamiento. Además, el uso de un agente antioxidante como N-acetil-cisteína inhibió el exporte de Nurr1 mediado por el arsenito sódico, del mismo modo que el mutante Nurr1NES2\*. Por tanto, este estudio ilustra que Nurr1 posee un mecanismo de regulación asociado al control de su localización subcelular y que el estrés oxidativo cambia este equilibrio en favor de la acumulación citosólica de Nurr1.

## 07.

### El factor transcripcional Sp1 regula la expresión del receptor purinérgico P2X7

P. García-Huerta<sup>a,b,c</sup>, M. Díaz-Hernández<sup>a,b,c</sup>, E. García-Delgado<sup>a,b,c</sup>, M. Pimentel-Santillana<sup>d</sup>, M.T. Miras-Portugal<sup>a,b,c</sup>, R. Gómez-Villafuertes<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. <sup>b</sup>Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>c</sup>Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital Clínico San Carlos. <sup>d</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols.

CSIC. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Los receptores purinérgicos se encuentran ampliamente distribuidos por el sistema nervioso central (SNC), estando presentes tanto en neuronas como en glía. Se dividen en dos grandes familias, dependiendo de su mecanismo de acción: receptores metabotrópicos P2Y y receptores ionotrópicos P2X. El receptor P2X7 pertenece a esta familia de canales catiónicos dependientes de ATP y media la entrada no selectiva de cationes cuando es activado por el ligando apropiado. Actualmente, se conocen siete miembros de esta familia, pero P2X7 se diferencia del resto en cuanto a su estructura molecular, farmacología y función. El receptor P2X7 tiene un papel importante tanto en procesos fisiológicos como patológicos dentro del SNC. Así, se encuentra implicado en el desarrollo neuronal embrionario/posnatal y en la aparición de diversos procesos neurodegenerativos, inflamatorios y tumorales donde los niveles de expresión del receptor P2X7 parecen ser cruciales. A pesar de ello, existe un gran desconocimiento sobre los mecanismos que regulan la expresión génica de este receptor en los distintos tejidos/células del SNC. Para esclarecer este tema, se ha clonado e identificado funcionalmente el promotor activo del gen *P2rx7* de ratón. Este promotor carece de cajas TATA y CAAT y contiene siete sitios putativos de unión para el factor de transcripción Sp1. Se delimitó una región promotora mínima de *P2rx7* (de -249 a +17) que contiene cuatro sitios SP1, dos de ellos altamente conservados en mamíferos. Se ha confirmado la funcionalidad de estos sitios SP1 por mutagénesis dirigida, sobreexpresión e interferencia de Sp1 en células de neuroblastoma murino N2a. Mediante el tratamiento con mitramicina A, se ha reducido la actividad transcripcional mediada por Sp1, disminuyendo los niveles endógenos del receptor P2X7 tanto en cultivos de neuronas y astrocitos corticales como en la línea de macrófagos murinos RAW 264.7. Usando el ratón transgénico P2rx7-EGFP, que expresa GFP bajo el promotor de P2X7, hemos obser-

vado una correlación entre la expresión del reportero y los niveles de Sp1 en el cerebro. Mediante el clonaje y la caracterización funcional del promotor, nuestros experimentos aportan la primera evidencia molecular de que Sp1 desempeña un papel decisivo en el control de la expresión del gen *P2rx7* en el sistema nervioso.

## 08.

### Los receptores P2X7 y P2Y2 regulan el procesamiento de la proteína amiloide a través de GSK3β

J.I. Díaz-Hernández<sup>a</sup>, R. Gómez-Villafuertes<sup>a</sup>, M. León-Otegui<sup>a</sup>, A. del Puerto<sup>c</sup>, J.J. Lucas<sup>c</sup>, J.J. Garrido<sup>b,c</sup>, J. Gualix<sup>a</sup>, M.T. Miras-Portugal<sup>a</sup>, M. Díaz-Hernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). <sup>c</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

La producción de péptido amiloide (Aβ) a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) es esencial en la formación de las placas seniles características de la enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo, las señales extracelulares que mantienen el balance entre los procesamientos proteolíticos amiloidogénicos y no amiloidogénicos de la APP, mediados por α-secretasa y β-secretasa, respectivamente, permanecen poco conocidos. En el presente trabajo, describimos la regulación del procesamiento de APP mediada por el receptor P2X7. En líneas celulares, la inhibición del receptor P2X7, tanto nativo como sobreexpresado, incrementa la actividad α-secretasa, efecto que parece estar mediado a través de la inhibición de la glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK3β). Por el contrario, la activación de P2X7 conduce a una reducción de la actividad α-secretasa en estos modelos. Por otro lado, la activación del receptor P2Y2 presente en estas células incrementa la actividad α-secretasa, lo que indica una estrecha regulación del procesamiento de APP a través de

los receptores purinérgicos. La inhibición *in vivo*, al incrementarse el procesamiento no amiloidogénico de APP por un aumento en la actividad α-secretasa del receptor P2X7 en el ratón J20, un modelo murino de la variante familiar de la EA, el cual expresa la APP humana con las mutaciones Swe/Ind, induce un descenso significativo del número de placas amiloides localizadas en el hipocampo. Esta disminución en el número de placas en los ratones tratados con el inhibidor de P2X7 coincide con un descenso en la actividad de GSK3β. Las evidencias *in vivo* mostradas en este trabajo demuestran el potencial terapéutico de la modulación de los receptores purinérgicos en el tratamiento de la EA familiar.

## 09.

### El polimorfismo P86L del canal de Ca<sup>2+</sup> CALHM1 induce mayor citotoxicidad en presencia de β-amiloide

A.J. Moreno Ortega<sup>a,b,c,d</sup>, I. Buendía<sup>a,b</sup>, J. Egea<sup>a,b</sup>, M. García-López<sup>a,b</sup>, A. García-García<sup>a,b,c,d</sup>, M.F. Cano-Abad<sup>a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup> Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. <sup>b</sup> Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>c</sup> Servicio de Farmacología Clínica. <sup>d</sup> Instituto de Investigaciones Sanitarias La Princesa. Hospital Universitario La Princesa. Madrid.

P86L-CALHM1, un polimorfismo del nuevo canal de Ca<sup>2+</sup> CALHM1, se relaciona con la etiopatogenia de trastornos degenerativos: enfermedad de Alzheimer (EA), epilepsia del lóbulo temporal o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. La expresión de P86L en la membrana celular media un transitorio de Ca<sup>2+</sup> citosólico y mitocondrial en forma de meseta y con un aclaramiento lento. Este patrón de Ca<sup>2+</sup> tan particular se traduce en una alteración en el procesamiento de la APP con un desbalance en el β-amiloide (βA). Es decir, hay más fracción de βA en detrimento de APP, con respecto a las condiciones control: CALHM1. Sin embargo, se desconocen las rutas de señalización intermedias que activa el Ca<sup>2+</sup> que entra a través de P86L y la interacción del βA y P86L. En este trabajo,

hemos querido averiguar el papel de P86L, Ca<sup>2+</sup> y βA en la señalización intracelular. Con ese propósito, hemos analizado la homeostasia del Ca<sup>2+</sup> citosólico y los patrones de expresión de proteínas relacionadas con la supervivencia celular, como CREB y ERK. Para ello, hemos utilizado células HeLa transfectadas transitoriamente con la forma nativa o mutada del canal CALHM1. Las medidas de Ca<sup>2+</sup> citosólico se han realizado con ecuatorinas dirigidas genéticamente al citosol. Los niveles proteicos se han determinado mediante *Western-blot*. Finalmente, se ha cuantificado la viabilidad celular mediante MTT. Hemos encontrado que, en las células transfectadas con P86L o CALHM1 y tratadas con βA (5 μM agregado), el patrón típico de Ca<sup>2+</sup> citosólico a través del canal desaparece, la expresión de CREB y ERK disminuye de forma significativa en las células que expresan P86L, pero no en aquellas que expresan el canal nativo, y existe una mayor vulnerabilidad celular en las células que expresan P86L. Los pacientes con EA homocigotos para P86L tienen un mayor riesgo de sufrir EA probablemente porque la expresión de P86L en presencia de βA confiere una mayor vulnerabilidad celular, al alterar rutas como ERK y CREB.

### Sesión 2. Neurotransmisión, neurosecreción y plasticidad sináptica

## 010.

### Distribución mitocondrial en células cromafines y su relación con la secreción

J. Villanueva-Roig, S. Viniegra, V. García, M. Francés, L.M. Gutiérrez  
Instituto de Neurociencias de Alicante. CSIC. Universidad Miguel Hernández. Alicante.

Mediante técnicas de microscopía confocal de alta resolución, utilizando marcadores fluorescentes específicos de mitocondria, se determinó la distribución de las mitocondrias en el interior de células cromafines en cultivo. Para ello, se procedió a medir las distancias

y posiciones de las mitocondrias con respecto a distintos elementos como la barrera cortical de actina y los componentes del complejo de fusión (SNAP25). Finalmente, se realizaron las mismas mediciones con respecto a los marcadores de secreción tras el estímulo (DBH). Nuestros datos evidenciaron que, en relación a la maquinaria secretora o la zona de fusión de vesículas, existen tres poblaciones mitocondriales: la primera de ellas colocalizaría con los puntos de fusión; la segunda estaría embebida en la barrera cortical de actina y se respondería a una distancia promedio de 300-400 nm de la zona de fusión; finalmente, existiría una población más interna, adyacente a la zona perinuclear, que en principio no interferiría en la homeostasis del calcio responsable del disparo de la exocitosis. Nuestros datos apoyarían la idea de que la población de mitocondrias más próxima a la zona de fusión podría actuar como un sistema de regulación de los niveles de calcio tras el estímulo, pudiendo a su vez contribuir a aportar el ATP necesario para el proceso de exocitosis.

## 011.

### Efectos del pH extracelular sobre la activación de los canales de calcio, la excitabilidad de membrana, las señales de calcio y la exocitosis en células cromafines

J.C. Fernández-Morales<sup>a,b</sup>, J.F. Padín-Nogueira<sup>a,b</sup>, D. Castro-Musial<sup>a</sup>, S. Vestring<sup>a</sup>, E. Calvo-Gallardo<sup>a,b</sup>, A. García-García<sup>a,b,c</sup>, A.M. García de Diego<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. <sup>b</sup> Departamento de Farmacología y Terapéutica. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>c</sup> Servicio de Farmacología Clínica. Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital Universitario La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

El influjo de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) conduce a numerosos eventos intracelulares, incluyendo la contracción muscular, la liberación de

neurotransmisores y la regulación en la transcripción de genes. Las familias Cav1 y Cav2 comprenden los CCDV que requieren una fuerte despolarización para ser activados, mientras que la familia Cav3 incluye los canales de calcio de bajo umbral de activación que se activan a voltajes más negativos y cercanos al potencial de reposo de membrana. Varios estudios han demostrado que el pH extracelular altera las propiedades de permeabilidad y apertura de los canales de calcio cardíacos de tipo T (Cav3) y tipo L (Cav1). Se han identificado importantes sitios de adición de protones sobre las moléculas proteicas de las familias Cav1 y Cav2, así como de Cav3, reacciones que estarían modificando la permeabilidad y selectividad de los CCDV. Estos estudios sugieren que los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  compiten con los  $\text{H}^+$  para neutralizar las cargas negativas de la superficie de la molécula proteica del CCDV, y por los sitios del interior del canal que controlan la selectividad y la permeabilidad, incluidos los residuos de aspartato y glutamato que conforman el filtro de selectividad del canal iónico. Numerosos trabajos han descrito el efecto de variaciones del pH extracelular modulando corrientes de calcio en diferentes tipos neuronales, células cardíacas, terminales nerviosos presinápticos, células musculares o células bipolares de la retina; sin embargo, apenas se encuentran estudios en célula cromafín que comprueben estas observaciones. En células HEK-293, transfectadas con los ADN codificantes de los distintos subtipos de canales de calcio, la acidificación de la solución del baño extracelular produce una despolarización de la membrana plasmática y una reducción en la amplitud del pico de corriente de calcio, mientras que una alcalinización de la solución extracelular produce el efecto contrario. Varios trabajos han descrito cambios sustanciales en el pH extracelular del sistema nervioso, incluso bajo una actividad normal; dichas variaciones en el pH extracelular son dependientes de la actividad celular y reguladas durante los ritmos circadianos. Muchas patologías —incluido el infarto cerebral, la hipoxia, la isquemia y la epilepsia— se acompañan de una acido-

sis extracelular con valores de pH inferiores a 7, mientras que otra patología como la hipocapnia se asocia con la alcalosis del pH extracelular. Los resultados que aportamos en este trabajo sugieren que acontece una modulación de los CCDV por efecto del pH también en células cromafines bovinas y células cromafines de ratón. Utilizando la técnica de *patch-clamp* bajo la configuración de parche perforado, y manteniendo fijos la corriente o el voltaje según corresponda, hemos observado que la alcalinización del medio extracelular produce una hiperpolarización del potencial de membrana, una disminución de la excitabilidad celular, que se traduce en el cese de los disparos de potenciales de acción espontáneos, y un incremento en la corriente de  $\text{Ba}^{2+}$  (que pasa a través de los CCDV) a voltajes más hiperpolarizantes. La perfusión de las células cromafines con una solución extracelular de Tyrode, que presenta un pH de alcalinidad leve (7,6-7,8) a moderada (8,1), promueve una respuesta secretora de catecolaminas modesta en el primero de los casos y masiva en el segundo, respuestas registradas mediante amperometría en célula única. La perfusión del baño extracelular con pH ácidos produce el efecto contrario sobre las corrientes de  $\text{Ba}^{2+}$ , un bloqueo reversible. En experimentos posteriores queremos observar el posible efecto de pH alcalinos y ácidos sobre los niveles de calcio citosólico, y si cambios en el pH extracelular pueden modificar otras corrientes iónicas en la célula cromafín ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ).

## 012.

### Cinética de la exocitosis activada por acetilcolina, potasio, cafeína e histamina en células cromafines del ratón C57

E. Calvo-Gallardo<sup>a,b</sup>, A. García-García<sup>a,b</sup>, A.M. García de Diego<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. <sup>b</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. <sup>c</sup>University College London. Londres, Reino Unido.

Las respuestas secretoras se han estudiado ampliamente en la célula cro-

mafín del ratón; sin embargo, no es posible encontrar un estudio que aborde el análisis de la cinética fina de la exocitosis en estas células. Por ello, y dado que los ratones C57 se utilizan habitualmente para desarrollar modelos transgénicos de diversas enfermedades, pensamos que sería de interés estudiar la cinética fina del evento exocitótico evocado por diferentes estímulos, tales como acetilcolina (neurotransmisor fisiológico), solución Tyrode de alto potasio (despolarizante clásico), cafeína (agonista del receptor de rianodina del retículo endoplásmico), histamina (libera calcio del retículo endoplásmico a través del receptor de IP3), DMPP (agonista nicotínico), muscarina (agonista muscarínico), y modulada por mecamilamina (bloqueante nicotínico) en el ratón C57-BL/6J. Siguiendo un protocolo de estimulación sostenida durante un minuto, en primer lugar, la acetilcolina (100  $\mu\text{M}$ ) activó una respuesta cuántica de vesículas únicas consistente en una ráfaga transitoria de espigas secretoras, seguida de una respuesta menor no inactivable; estas dos respuestas podrían asociarse, respectivamente, a la activación de los receptores nicotínicos (que sufrirían un proceso más rápido de inactivación) y de los muscarínicos (que no se inactivarían). La respuesta evocada por el estímulo despolarizante de la solución Tyrode de alto potasio (75 mM) fue, en gran medida, similar a la provocada por la acetilcolina, pero de mayor relevancia al inicio del pulso y de carácter inactivante (debido a la inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje). Las respuestas suscitadas por los estímulos de cafeína (20 mM) e histamina (100  $\mu\text{M}$ ) son totalmente opuestas: la cafeína provocó una exocitosis masiva al inicio del pulso, con presencia de una fuerte envoltente de oxidación, y que tras ello desaparece casi completamente, mientras que la histamina ocasionó una respuesta de carácter constante durante el pulso, pero sin ráfaga inicial. La exocitosis generada por los agonistas nicotínico y muscarínico nos contrarió: por un lado, el DMPP (30  $\mu\text{M}$ ) evocó una fuerte exocitosis inicial, pero no totalmente inactivante (con-

trario a lo que cabría esperar); por otro lado, la muscarina (30  $\mu\text{M}$ ) generó una secreción que no ocurre durante el pulso, sino tras varios segundos de acabar éste. Finalmente, al estimular con acetilcolina más el bloqueante nicotínico mecamilamina (100 nM), pudimos observar una respuesta secretora que, comparada con la producida por la acetilcolina, disminuye la ráfaga inicial pero mantiene la respuesta no inactivante. El análisis fino de las espigas únicas arrojó datos interesantes: existe una diferencia notable y significativa entre los modelos de espiga evocados por los diferentes estímulos utilizados, en cuanto a amplitud, carga y tiempo y velocidad de crecimiento y caída, además de los parámetros de los pies de espiga. Usando un protocolo de estimulación rápida de 2 s cada 10 s (forzando la exocitosis continua sin dejar tiempo suficiente para la recuperación) con acetilcolina y solución Tyrode de alto potasio fue posible estudiar cómo las vesículas son reclutadas de los depósitos no inmediatamente listos para ser liberados, además de arrojar datos sobre el fenómeno de *kiss'n'run* y el reciclaje de vesículas. Estos datos constituyen la base para realizar próximos experimentos comparativos de estudio de alteraciones en la liberación de neurotransmisores en ratones C57 transgénicos modelos de la enfermedad de Alzheimer (mutante APP/PS1) y de esclerosis lateral amiotrófica (mutante SOD1-G93A).

## 013.

### Regulación de la liberación diferencial de adrenalina y noradrenalina por los cotransmisores vesiculares de la célula cromafín

A. Wojnicz<sup>a,c</sup>, E. Calvo-Gallardo<sup>a,b</sup>, R. de Pascual-Castillo<sup>a,b</sup>, L. Quesada-García<sup>a,c</sup>, S.M. Herrero<sup>a,b</sup>, L. Gandía<sup>a,b</sup>, A. Ruiz-Nuño<sup>a,c</sup>, A. García-García<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. <sup>b</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>c</sup>Servicio de Farmacología Clínica. Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital

Universitario La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

La cotransmisión implica la liberación exocitótica de un neurotransmisor y de otros compuestos que se almacenan con él en la misma vesícula secretora. En la célula cromafín, las vesículas secretoras almacenan noradrenalina (NA) —sólo en las células noradrenérgicas— y adrenalina —sólo en las células adrenérgicas—; con estas catecolaminas se almacenan también grandes cantidades de ATP, opioides y las proteínas de carácter ácido cromograninas. Durante el proceso de la exocitosis que acontece durante el estrés, se liberan contenidos vesiculares, cuyas funciones fisiológicas se conocen poco. Puesto que la NA y la adrenalina poseen funciones fisiológicas distintas pero complementarias en la adaptación al estrés, cabe preguntarse también si la modulación de su liberación diferencial por el ATP, los opioides y las cromograninas sería distinta para una y otra catecolamina. En este contexto, el objetivo general de este estudio plantea la exploración de la posible modulación de la liberación diferencial de NA y adrenalina por los cotransmisores vesiculares de las células cromafines noradrenérgicas y adrenérgicas, aisladas a partir de médula suprarrenal bovina. En nuestros laboratorios, hemos estudiado detenidamente la regulación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ , que fluye por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , y su modulación por ATP y metionina-enkefalina. Sin embargo, tanto en otros laboratorios como en el nuestro, hemos prestado poca atención al estudio de las consecuencias de esa modulación sobre la respuesta secretora. Esta incipiente investigación pretende dar respuesta a esa pregunta. Las células cromafines bovinas ( $5 \times 10^6$  por experimento) se atrapan sobre un filtro en una microcámara y se perfunden con una solución Krebs-Hepes que incluye 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , a 37 °C. Las células se estimulan con 30  $\mu\text{M}$  de acetilcolina y 35 mM de  $\text{K}^+$ , con pulsos de 1 min de duración. La secreción de catecolaminas totales se determinó en tiempo real con un amperómetro. Además, los líquidos de perfusión se recogieron a intervalos de 10-20 s para analizar la secreción dife-

rencial de NA y adrenalina. A 3  $\mu\text{M}$ , el ATP aumentó un 20% la secreción global de catecolaminas. También a 3  $\mu\text{M}$ , la metionina-enkefalina aumentó la amplitud de la respuesta secretora, pero redujo de forma significativa la secreción global de catecolaminas, indicando su pronta inactivación. Esta estrategia de estudio en tiempo real y en condiciones fisiológicas de la secreción de catecolaminas aportará datos valiosos sobre su modulación por cotransmisores en situaciones de estrés.

#### O14.

##### FTY720: un análogo de la esfingosina que potencia la liberación cuantitativa de catecolaminas

V. García-Martínez, J. Villanueva-Roig, C.J. Torregrosa-Hetland, M.M. Francés, S. Viniegra, B. Davletov, L.M. Gutiérrez-Pérez

Instituto de Neurociencia de Alicante. CSIC. Universidad Miguel Hernández. Alicante.

El procesamiento enzimático de algunos lípidos constituyentes de las membranas celulares da lugar a lípidos señal que actúan gobernando diferentes procesos fisiológicos. En concreto, el ácido araquidónico y la esfingosina modulan la actividad secretora de neuronas y modelos neuroendocrinos. Estas sustancias ejercen su acción sobre la fusión de vesículas individuales modificando parámetros de la cinética de fusión vesicular, estudiada con aerometría. Recientemente, se ha aprobado el uso del FTY720 (fingolimod), un análogo de la esfingosina, para el tratamiento de la esclerosis múltiple, por lo que nos planteamos si esta sustancia podría afectar a la liberación de neurotransmisores por células cromafines. Nuestros resultados indican que este fármaco altera la fusión de gránulos cromafines, prolongando de manera drástica el tiempo de apertura del poro de fusión e incrementando con ello la liberación cuantitativa de catecolaminas. Así, tanto lípidos señal como análogos estructurales de éstos poseen la capacidad de modificar las propiedades cinéticas y la cantidad de neurotransmisores liberados en los eventos de fusión exocitótica.

#### O15.

##### Regulación del reciclamiento vesicular sináptico mediada por cGK2 en neuronas granulares de cerebelo

A. Collado-Alsina, J.J. Ramírez-Franco, J. Sánchez-Prieto, M. Torres

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

El óxido nítrico y el GMPc están implicados en el desarrollo neuronal desde las primeras fases de la neurogénesis y la migración celular hasta la sinaptogénesis. Esta diversidad de funciones fisiológicas están mediadas por diferentes efectores, entre los que se incluyen fosfodiesterasas reguladas por GMPc, serina/treonina cinasas dependientes de GMPc (cGK1 y cGK2) y canales iónicos regulados por GMPc. Previamente demostramos que, en neuronas granulares de cerebelo, el GMPc tiene una gran influencia en el crecimiento de las neuritas y en la maduración y funcionalidad de los botones sinápticos, a pesar de que los mecanismos moleculares implicados en estos procesos no se conocen. El hecho de que la expresión de cGK2 aumente con el desarrollo celular y de que se localice en las sinapsis hacía pensar que esta proteína podría estar implicada en las acciones del GMPc. Cuando se analizó el porcentaje de botones funcionales mediante la incorporación a las vesículas exocitadas de un anticuerpo fluorescente, que reconoce un dominio intraluminal de la sinaptotagmina, respecto al total de botones marcados con un anticuerpo frente a la proteína Bassoon, observamos que tanto el silenciamiento de la expresión de cGK2 con un siRNA específico como la inhibición prolongada de su actividad con KT5823 conducen a una importante reducción en el número de botones sinápticos funcionales. Usando la sonda fluorescente FM1-43 para monitorizar el reciclamiento vesicular, hemos observado que los diferentes botones sinápticos reciclan sus vesículas con distintas eficiencias. La ausencia de la proteína cGK2 o su inhibición a largo plazo con el inhibidor farmacológico KT5823 incrementa

enormemente la proporción de botones que reciclan sus vesículas de forma ineficiente, mostrando una pérdida muy débil de la sonda fluorescente en respuesta a la estimulación. Asimismo, la supresión de la expresión de la proteína cGK2 o su inhibición produce cambios ultraestructurales relacionados con el número y la distribución de las vesículas en los botones sinápticos.

#### O16.

##### Los receptores $\beta$ -adrenérgicos activan la proteína Epac y potencian la liberación de glutamato modulando la maquinaria exocitótica en terminales presinápticos de corteza cerebral

J.J. Ferrero-López<sup>a</sup>, A.M. Álvarez<sup>a</sup>, J. Ramírez-Franco<sup>a</sup>, D. Bartolomé-Martín<sup>a</sup>, F. Ciruela<sup>b</sup>, M. Torres<sup>a</sup>, J. Sánchez-Prieto<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

<sup>b</sup>Facultad de Medicina-Bellvitge. Universitat de Barcelona. L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.

La generación de cAMP potencia la transmisión sináptica por distintos mecanismos. Se ha descrito que el cAMP potencia la transmisión sináptica modulando proteínas de la maquinaria exocitótica como RIM, implicada en la preparación de las vesículas sinápticas para la fusión. Sin embargo, se ha descartado la fosforilación de RIM por la proteína cinasa A (PKA) como responsable de la potenciación de la transmisión sináptica iniciada por el cAMP, por lo que permanecen sin esclarecerse los mecanismos por los cuales el cAMP modula la maquinaria exocitótica y los posibles receptores presinápticos implicados en la activación de esta vía de señalización. En terminales presinápticos cerebrocorticales, la potenciación de la liberación de glutamato por el activador de la adenilato ciclasa forskolina presenta un componente PKA-dependiente sensible al bloqueante de los canales de sodio tetrodotoxina. Sin embargo, un componente resistente a tetrodotoxina e independiente de los canales de calcio dependientes de voltaje podría

estar asociado a la modulación de la maquinaria exocitótica. El agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos isoproterenol mimetiza las acciones de forskolina, potenciando la liberación por una vía independiente de PKA en la que, sin embargo, participa el factor intercambiador de nucleótidos cíclicos activado por cAMP, Epac. La señalización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y la activación de Epac activa la fosfolipasa C y la hidrólisis de fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato, generando diacilglicerol e inositol trisfosfato. Esta respuesta de potenciación de la liberación de glutamato depende parcialmente de la actividad de la fosfolipasa C, aunque es totalmente independiente de la actividad de la proteinasa C. La potenciación por isoproterenol y por la activación de Epac se asocia a la translocación dependiente de diacilglicerol de la proteína Munc13-1, implicada en la preparación de las vesículas sinápticas para la exocitosis. La microscopía electrónica de los botones sinápticos muestra que tanto el isoproterenol como el activador de Epac promueven el acercamiento de las vesículas sinápticas a la membrana presináptica, lo que sugiere la modulación de la maquinaria exocitótica.

## O17.

### Silenciamiento sináptico mediado por cannabinoides

J.J. Ramírez-Franco, D. Bartolomé-Martín, B. Alonso, M. Torres, J. Sánchez-Prieto

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

Entre las numerosas formas descritas de plasticidad sináptica, el silenciamiento sináptico podría clasificarse como la forma más abrupta de depresión sináptica. Una sinapsis silente es aquella que no muestra ningún tipo de respuesta exocitótica, a pesar de experimentar una entrada de calcio normal ante la llegada de un potencial de acción y de poseer un número de vesículas comparable a una sinapsis activa. Los mecanismos por los que una sinapsis experimenta este tipo de plasticidad sólo se conocen parcialmente. Los endocannabinoides son men-

sajeros retrógrados ampliamente implicados en la regulación de la transmisión sináptica en numerosas sinapsis del sistema nervioso central y, en concreto, en la regulación de la depresión a largo plazo en la sinapsis establecida entre las fibras paralelas de las células granulares de cerebelo y las dendritas de las neuronas de Purkinje. En el presente trabajo hemos estudiado la inducción del silenciamiento sináptico mediante la activación del receptor de cannabinoides de tipo 1 (CB1R) y las posibles vías implicadas en este fenómeno, mediante el uso de dos estrategias de monitorización del ciclo vesicular, la sonda FM1-43 y una variante modificada del transportador de glutamato de tipo I (VGluT1) unida a GFP que permite monitorizar, en célula viva y a tiempo real, la dinámica de exocitosis y endocitosis en las sinapsis durante periodos de estimulación. La inducción de silenciamiento es atribuible a la activación de CB1R, pues es abolida mediante el uso de rimonabant (antagonista selectivo de CB1) y requiere una exposición prolongada al agonista HU-210, como demuestran los experimentos de FM1-43 y sinaptofluorina. Este efecto no es reproducible mediante una activación breve del mencionado receptor. El silenciamiento sináptico mediado por la activación del receptor CB1 parece ser independiente de la inhibición de la entrada de calcio, como demuestran los experimentos llevados a cabo en presencia de concentraciones supra fisiológicas de calcio, y es revertido por la coincubación con forskolina, activador de la adenilato ciclasa. La reversión de estos efectos parece dependiente de la activación de dos dianas de la vía del AMPc, la proteinasa A (PKA) y el factor intercambiador de nucleótidos de guanina activado por AMPc (EPAC), lo que queda demostrado por el uso de su agonista selectivo (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP), que conllevó una reversión del efecto de silenciamiento inducido por HU-210. Además, tras el estudio ultraestructural, la inducción del silenciamiento se acompañó de una retracción de las vesículas más cercanas a la zona activa tanto en sinaptosomas de corteza como en neuronas granulares de cerebelo en cultivo, efecto que

no se manifestó en sinaptosomas que provenían de animales *knock-out* del receptor CB1 (Cnr1 KO). Estos resultados indican que la activación del receptor CB1 conduce a la inhibición de la adenilato ciclasa y que esta inhibición conlleva, vía mecanismos dependientes de PKA y EPAC, una retracción de vesículas próximas a la zona activa que acompañan al silenciamiento. Experimentos de inmunocitoquímica *post hoc* en redes de neuronas en cultivo demostraron que la susceptibilidad de silenciamiento de sinapsis individuales viene determinada por la relación de contenidos de RIM1 $\alpha$  (*rab interacting molecule*) y CB1R. El contenido de otras proteínas implicadas en la formación del complejo de fusión, como es el caso de Munc13-1, no parece crucial a la hora de determinar la sensibilidad al silenciamiento.

## Sesión 3. Señales de calcio y vías de señalización celular

## O18.

### Un nuevo papel para el intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática (INC) revelado a temperatura fisiológica: conformación de las señales de Ca<sup>2+</sup> y exocitóticas durante la despolarización de las células cromafines

J.A. Arranz-Tagarro <sup>a,b,d</sup>, J.F. Padín-Nogueira <sup>a,b</sup>, J.C. Fernández-Morales <sup>a,b</sup>, R. Olivares <sup>e</sup>, S. Vestring <sup>a,f</sup>, E. Calvo-Gallardo <sup>a,b</sup>, A. García-García <sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. <sup>b</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>c</sup>Servicio de Farmacología Clínica. Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital Universitario La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. <sup>d</sup>Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, A Coruña. <sup>e</sup>Instituto de Neurociencias de Alicante. CSIC. Universidad Miguel Hernández. Alicante. <sup>f</sup>Facultad de Medicina Carl Gustav Carus. Universidad Técnica de Dresde. Dresde, Alemania.

Tanto la actividad del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática (INC) como la liberación exocitótica de catecolaminas de las células cromafines son muy sensibles a la temperatura. En esta investigación hemos aprovechado esta circunstancia para explorar los efectos del KB-R7943 (KBR), un bloqueador del INC, sobre la cinética de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> (I<sub>Ca</sub>), las variaciones transitorias de la concentración citosólica de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) y la liberación exocitótica de catecolaminas, monitorizados en una sola célula o en poblaciones de células, generadas por pulsos de alto K<sup>+</sup>—despolarización celular y entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (CCDV)— o por cafeína o histamina—liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplasmático—, a 22 y 37 °C. A 22 °C, los efectos del KBR sobre estos parámetros fueron escasos o nulos. Sin embargo, a 37 °C, que se está moviendo Ca<sup>2+</sup> mediante el INC a una velocidad cinco veces mayor que a 22 °C, los distintos efectos de KBR fueron más pronunciados: ausencia de efectos sobre la I<sub>Ca</sub>, reducción de la amplitud de las variaciones transitorias de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y desaceleración de su tasa de aclaramiento, bloqueo de la liberación cuántica de catecolaminas inducida por K<sup>+</sup>, bloqueo de la liberación de salvos de espigas inducida por K<sup>+</sup>, ausencia de efecto en la liberación de catecolaminas inducida por pulsos despolarizantes (PD) cortos de K<sup>+</sup> (1-2 s) y bloqueo de las respuestas producidas por PD más largos de K<sup>+</sup> (3-5 s), ausencia de efecto sobre la liberación de catecolaminas inducida por Ca<sup>2+</sup> en células sometidas a electroporación, y potenciación de la secreción inducida por histamina o cafeína. Sobre la base de estos resultados proponemos que, bajo condiciones de temperatura fisiológica, el INC puede contribuir a conformar la cinética de las variaciones transitorias de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y las respuestas exocitóticas inducidas por un PD, en dos etapas: primero, durante la despolarización, el modo reverso del INC puede contribuir sustancialmente a la entrada de Ca<sup>2+</sup>; esta contribución puede ser particularmente relevante (aunque a una menor tasa en comparación con los CCDV) a PD

más largos (3-10 s) en los cuales los CCDV experimentan una pronunciada inactivación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y voltaje. Segundo, tras la finalización de los PD, el modo directo del INC puede contribuir a un aclaramiento acelerado del  $\text{Ca}^{2+}$  de las variaciones transitorias de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  generadas en zonas adyacentes a la membrana plasmática. Estas acciones en dos pasos podrían colaborar en el mantenimiento de una respuesta saludable de la liberación de catecolaminas, particularmente bajo condiciones de estrés prolongado en las que los CCDV pueden inactivarse sustancialmente.

## O19.

### Modulación por el calcio del canal de calcio asociado al receptor nicotínico $\alpha 7$

R. de Pascual-Castillo<sup>a,b</sup>, C. Pérez de Nanclares<sup>a,b</sup>, I. Colmena<sup>a,b</sup>, M. Maroto-Pérez<sup>a,b</sup>, A. García-García<sup>a,b,c</sup>, L. Gandía<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. <sup>b</sup> Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>c</sup> Servicio de Farmacología Clínica. Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital Universitario La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Los canales iónicos permeados por el  $\text{Ca}^{2+}$  se activan por el voltaje –canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCVD)–, por el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico –canal capacitativo–, por segundos mensajeros –canales asociados a los receptores IP3 y rianodina del retículo endoplásmico– o por neurotransmisores tipo glutamato –canales NMDA o AMPA– o acetilcolina (ACh) –receptor nicotínico  $\alpha 7$ –. El propio  $\text{Ca}^{2+}$ , que permea estos canales, produce su inactivación cuando su concentración citosólica se eleva en el entorno del canal ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ). Tal es el caso de los CCVD de la célula cromafin bovina, cuyas corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (ICA), la elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  y la respuesta excitotóxica de catecolaminas se inhiben con la despolarización prolongada y cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se acumula en el entorno de los canales. Resulta llamativo el hecho de que la inhabilitación del secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria con el protonóforo FCCP pro-

duzca una rápida inactivación de los CCVD. La pregunta de si el  $\text{Ca}^{2+}$  modula el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  asociado al receptor nicotínico  $\alpha 7$  la hemos explorado en células de neuroblastoma humano que sobreexpresan este canal. La corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que fluye por este canal, cuando la célula se estimula con ACh (IACh), se exploró con la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula entera. La aplicación de pulsos de 100  $\mu\text{M}$  de ACh, junto con el modulador nicotínico  $\alpha 7$  PNU120596 (3 y 10  $\mu\text{M}$ ), produjo una IACh de 5 nA en 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y 3,5 nA en 20 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ; la interrupción del secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria con la asociación oligomycin-rotenuona (OR) o con el protonóforo FCCP redujo la IACh un 60-80%, y la retirada de los compuestos ocasionó una rápida recuperación de la amplitud inicial de IACh. Estos experimentos sugieren que la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  podría estar regulando la IACh modulada por PNU, vía canales de  $\text{Ca}^{2+}$   $\alpha 7$ . El mecanismo de esta regulación se encuentra en fase de estudio en nuestro laboratorio.

## O20.

### La manipulación farmacológica de los reservorios de calcio intracelular produce diferencias en la contracción aórtica por noradrenalina entre los modelos de rata hipertensa SHR y el modelo inducido por estreptozotocina

J.F. Padín-Nogueira<sup>a,b</sup>, D. Castro-Musial<sup>d</sup>, J.C. Fernández-Morales<sup>a,b</sup>, E. Calvo-Gallardo<sup>a,b</sup>, M. Maroto-Pérez<sup>a,b</sup>, J.A. Arranz-Tagarro<sup>a,b,e</sup>, A. García-García<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. <sup>b</sup> Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>c</sup> Servicio de Farmacología Clínica. Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital Universitario La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. <sup>d</sup> Departamento de Farmacología. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, Brasil. <sup>e</sup> Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, A Coruña.

La hipertensión arterial se caracteriza por un incremento sostenido en la presión arterial (> 140 mmHg sistólica y > 90 mmHg diastólica), siendo más frecuente en diabéticos que en la población general. A su vez, la diabetes se caracteriza por una elevada concentración de glucosa en sangre, bien por una deficiencia en la insulina (diabetes tipo I) o por una insensibilidad de las células del cuerpo a la acción de ésta (tipo II). La hipertensión y la diabetes tienen en común una disfunción en el eje hipotálamo-simpático-adrenal. Desde el punto de vista farmacológico, las alteraciones que se producen en estas patologías tienen en común la deficiencia de los mecanismos intracelulares que regulan las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ), donde reciben un especial protagonismo los orgánulos celulares como la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE). Por este motivo, nos planteamos estudiar comparativamente la función de la mitocondria y del RE en el control del tono vascular de anillos aórticos intactos. Para ello, hemos utilizado un modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR) y un modelo de hipertensión arterial y diabetes inducido farmacológicamente, la rata Wistar Kyoto (WKY) tratada con estreptozotocina (60 mg/kg/intraperitoneal). Las SHR se utilizaron a partir de 15 semanas de edad, momento en el que ya tienen una hipertensión arterial sistólica establecida ( $211,7 \pm 4,1$  mmHg). Como control natural de las SHR hemos usado su congénere no hipertenso, las ratas WKY, que mostraron una presión arterial sistólica de  $136,1 \pm 3,2$  mmHg. Además, a las ratas WKY les fue inducida hipertensión y diabetes, que se desarrollaron a la cuarta semana del tratamiento con estreptozotocina. En estos animales, los niveles plasmáticos de glucosa a los dos días del tratamiento con estreptozotocina fueron de  $461,1 \pm 60$  mg/dL, y la presión arterial sistólica, de  $163,1 \pm 1,88$  mmHg. El estudio de la respuesta vasoconstrictora se realizó en anillos aórticos provistos de endotelio realizando curvas acumulativas de concentración-respuesta (CACR) a noradrenalina a concentraciones comprendidas entre 0,1 nM y 100  $\mu\text{M}$ . Para estudiar la función de la mitocondria en el

control del tono vascular hemos realizado CACR a noradrenalina pre y postincubación durante 15 minutos del fármaco CGP37157 (CGP; 3  $\mu\text{M}$ ; bloqueante del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial) y del protonóforo FCCP 5  $\mu\text{M}$ . Para estudiar la función del RE hemos utilizado la combinación de cafeína 20 mM, rianodina 0,1  $\mu\text{M}$  y taspigargina 1  $\mu\text{M}$ . Por último, se han estudiado los efectos inotrópicos positivos de la angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) sobre las aurículas derecha e izquierda. Los resultados obtenidos demuestran que el CGP y el FCCP afectan de manera diferente a la CACR de noradrenalina en los distintos modelos animales de hipertensión empleados en relación a las ratas WKY control. Además, la combinación de cafeína, taspigargina y rianodina produce una mayor liberación de calcio del RE en las SHR que en las ratas diabéticas e hipertensas, sugiriendo una mayor sobrecarga de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Estos resultados indican que existe una participación diferencial de estos orgánulos celulares en la hipertensión arterial. La mayor sobrecarga de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en las SHR puede tener una correlación con la mayor hipertrofia cardíaca de estos animales:  $1,22 \pm 0,03$  g de peso de la aurícula izquierda ( $p < 0,05$ ; ANOVA *one-way*) en comparación con los diabéticos ( $0,95 \pm 0,07$  g) y los WKY ( $1,02 \pm 0,02$  g), así como con los efectos inotrópicos negativos de la angiotensina II en la aurícula derecha (en donde  $\text{SHR} < \text{WKY} < \text{diabética}$ ) e izquierda (en donde  $\text{WKY} < \text{SHR} < \text{diabética}$ ). En conclusión, aunque la alteración en la regulación de la homeostasis del calcio está siempre presente en la hipertensión arterial en los modelos animales estudiados, los mecanismos y las consecuencias que generan esta alteración no son los mismos.

## Sesión 4. Neuroprotección, neurorregeneración y neurorreparación

### 021.

#### Dianas no convencionales para el diseño de fármacos para enfermedades neurodegenerativas

R. León<sup>a,b</sup>, J. Egea<sup>b</sup>, I. Buendía<sup>b</sup>, E. Parada<sup>b</sup>, E. Navarro<sup>b</sup>, P. Rada<sup>c</sup>, A. Cuadrado<sup>c</sup>, M. García-López<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Farmacología Clínica. Fundación de Investigación Biomédica. Hospital Universitario La Princesa.  
<sup>b</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.  
<sup>c</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Las enfermedades neurodegenerativas se han convertido en uno de los principales problemas de las sociedades del llamado 'primer mundo'. El envejecimiento de la población, junto con el estilo de vida de estas sociedades, está provocando un incremento exponencial de este tipo de patologías. Hasta el momento, todos los intentos de desarrollar un fármaco efectivo contra estas enfermedades han fracasado y, por tanto, se impone un cambio en las teorías en las que se basa el diseño de nuevos fármacos. Debido a que se están describiendo mecanismos comunes de neurodegeneración, como la disfunción mitocondrial o la producción de especies reactivas de oxígeno, el uso de dianas comunes a todos los procesos neurodegenerativos podría ser una estrategia efectiva para estas enfermedades. En este trabajo presentamos el diseño de nuevos compuestos dirigidos a dianas no convencionales para el tratamiento de patologías neurodegenerativas. Estas nuevas dianas se han seleccionado teniendo en cuenta los últimos estudios que relacionan estrechamente el estrés oxidativo, la respuesta antioxidante de fase II y su relación con la evolución de patologías neurodegenerativas.

### 022.

#### Perfil anticolinesterásico, neuroprotector y toxicológico de nuevas benzocromenotacrininas con potencial terapéutico en la enfermedad de Alzheimer

M. Esquivias-Pérez, M.P. González-González, V. Bellver-Landete, A. Romero, C. Arce de Obieta, J.L. Marco-Contelles, M.J. Oset-Gasque

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

Hemos investigado la actividad anticolinesterásica, la capacidad neuroprotectora frente a bloqueantes de la cadena respiratoria mitocondrial y la potencial neuro y hepatotoxicidad de una nueva serie de 14-aril-10,11,12,14-tetrahidro-9H-benzo[5,6]cromeno[2,3-b]quinolin-13-aminas racémicas, en adelante benzocromenotacrininas (BCT) 1-14. El ensayo de la actividad acetilcolinesterasa (hAChE), mediante el método de Ellman, demostró que las BCT ensayadas son, en general, potentes inhibidores de la misma, con excepción de las BCT 12-14 (XS7, CIIV y CI7), resultados que se relacionan con la capacidad donadora de electrones de las BCT 1-11 y con la capacidad aceptora de las BCT 12-14. El análisis de la cinética de inhibición enzimática para la BCT 10 (C14) (con sustituyente n=3', 4',di-OMe), BCT con el mejor perfil anticolinesterásico (IC<sub>50</sub> = 0,083 ± 0,024 μM) y gran capacidad neuroprotectora, indica la existencia de dos mecanismos de inhibición enzimática: uno, a bajas concentraciones de fármaco, de tipo competitivo (K<sub>i1</sub> = 0,007 ± 0,001 μM), y otro, a altas concentraciones de tipo mixto (K<sub>i2</sub> = 0,72 ± 0,06 μM), resultado que concuerda con la existencia de dos sitios de unión a la hAChE, el CAS (sitio activo catalítico) y el PAS (sitio aniónico periférico). Con respecto a su actividad inhibidora de la butirilcolinesterasa (hBtChE), en general todos los compuestos mostraron ser malos inhibidores de dicha actividad. Los compuestos más efectivos fueron BCT 9 (U3) (IC<sub>50</sub> ~ 30 μM), seguido de BCT 6 (C3) y BCT 5 (C7) (IC<sub>50</sub> ~ 50 μM). Todos los demás compuestos mostraron una IC<sub>50</sub> >

100 μM. Esta característica las diferencia de la tacrina, que mostró ser un importante inhibidor de esta actividad (IC<sub>50</sub> ~ 0,05 μM). El efecto neuroprotector de las BCT se estudió mediante medidas de la viabilidad neuronal (test XTT) en cultivos primarios de neuronas corticales tratadas con una mezcla de agentes bloqueantes de la cadena respiratoria mitocondrial: oligomicina, bloqueante del complejo V, y rotenona, bloqueante del complejo I. Este estudio mostró que las BCT 1-11, con grupos donadores de electrones en el anillo aromático en C14, revirtieron significativamente la disminución de la viabilidad neuronal producida por la mezcla de oligomicina y rotenona, de forma dependiente de la concentración, siendo las más potentes las BCT 10 (C14) y 11 (Gu3) (con agrupamientos n=3', 4',di-OMe y 3',4',5',tri-OMe, respectivamente, en el anillo aromático en C14), que llegaron a recuperar el 100% de viabilidad de los controles en concentraciones de 10 μM. Por el contrario, las BCT 12-14, con grupos aceptores de electrones en el anillo aromático en C14, sólo ejercieron débiles efectos neuroprotectores. Además, las BCT 1-11, en concentraciones de 1-50 μM, no tuvieron ningún efecto neurotóxico basal. Solamente las BCT 12-14 tuvieron un efecto neurotóxico significativo en concentraciones de 10 y 100 μM. Este estudio se realizó porque los efectos neuroprotectores de tacrina decrecen en concentraciones mayores de 25 μM, debido a su efecto neurotóxico en altas concentraciones. Los análisis de hepatotoxicidad realizados sobre la línea celular de hepatoma humano HepG2 mostraron que las BCT mejoran considerablemente la hepatotoxicidad inducida por el compuesto de referencia, tacrina. Se seleccionaron las BCT 11 (Gu3), 7 (CH4) y 10 (C14) con el mejor perfil de toda la serie, evidenciándose que, en las más altas concentraciones ensayadas (300 μM), estas moléculas demostraron ser del orden de 2,25 a 2,01 veces menos hepatotóxicas que tacrina. En conclusión, las nuevas BCT 1-11, y especialmente BCT 10 y 11, podrían ser buenos fármacos potenciales en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer.

### 023.

#### Nuevos derivados de gramina como agentes neuroprotectores

M.R. Lajarín-Cuesta<sup>a</sup>, L. González-Lafuente<sup>b</sup>, F.J. Martínez-Sanz<sup>a</sup>, M. Villarroja<sup>a</sup>, C. de los Ríos<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>b</sup>Fundación de Investigaciones Biomédicas. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Hospital Universitario La Princesa. Madrid.

Cada vez son más numerosas las evidencias que muestran que la disfunción mitocondrial, la desregulación del Ca<sup>2+</sup> celular y el estrés oxidativo son procesos clave en la patogénesis de los trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. En nuestra búsqueda de nuevos cabezas de serie que tengan como diana dichas alteraciones, el alcaloide natural gramina y sus derivados se han descrito como reguladores del Ca<sup>2+</sup> celular actuando sobre varias de las principales organelas implicadas en su fina regulación. Por este motivo, creemos que la síntesis y evaluación de nuevos derivados de gramina puede aportar una nueva familia de compuestos neuroprotectores. Los nuevos compuestos sintetizados se someten a un cribado farmacológico con el fin de determinar su perfil neuroprotector. La mayoría de los compuestos ensayados muestran un efecto protector significativo frente al modelo de sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> inducida por glutamato (en rodajas de hipocampo de rata) y frente al modelo de hiperfosforilación de la proteína tau inducida por ácido okadaico (en células SH-SY5Y). Sin embargo, carecen de actividad frente al modelo de estrés oxidativo inducido por rotenona y oligomicina A (en células SH-SY5Y), dentro del rango de concentraciones evaluadas. El esquema de síntesis utilizado ha proporcionado una vía óptima para la preparación de los derivados de gramina propuestos, con rendimientos altos y en dos pasos sintéticos. Los nuevos derivados han mostrado un prometedor perfil neuroprotector frente a dos de los tres modelos de neurodegeneración.

ción evaluados. Por ello, creemos que nos encontramos ante una potencial nueva familia de compuestos con indicación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

## 024.

### Rutas neuroprotectoras activadas por ConBr, una lectina aislada de las semillas de *Canavalia brasiliensis*

D.K.R. Venske<sup>a</sup>, R.M.S. Cunha<sup>b</sup>, M. William-Lopes<sup>a</sup>, A.P. Costa<sup>a</sup>, J. Budni<sup>a</sup>, A.L.S. Rodrigues<sup>a</sup>, K.S. Nascimento<sup>c</sup>, B.S. Cavada<sup>c</sup>, R.B. Leal<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica. Centro de Ciencias Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.

<sup>b</sup>Universidade do Vale do Acaraú (UVA). Sobral, CE. <sup>c</sup>BioMollab. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE, Brasil.

En el sistema nervioso central, la mayoría de los receptores, canales iónicos y transportadores de neurotransmisores son glicoproteínas, cuyas cadenas de glicanos constituyen elementos moduladores clave. Las lectinas son proteínas que reconocen y se unen a complejos de hidratos de carbono que sobresalen de los glicoconjugados. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la proteína ConBr, una lectina aislada de las semillas de *Canavalia brasiliensis*, puede modular los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos, induciendo un efecto antidepressivo en ratones. Además, ConBr revierte la neurotoxicidad inducida por ácido quínico, lo que sugiere una actividad neuroprotectora a través de la inhibición del receptor de NMDA. En base a estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue dilucidar las vías de transducción de señales moduladas por ConBr que podrían estar potencialmente asociadas a sus efectos antidepressivos y neuroprotectores. Para ello, se inyectó ConBr (10 µg) intracerebroventricular y se extrajeron los hipocampos 0,5, 1, 3, 6, 8, 12, 18 y 24 h después del tratamiento. La administración de ConBr (0,5-3 h) promovió la activación de las proteincinasas Akt, ERK1 y PKA, sin afectar a CaMKII, p38MAPK y la actividad de JNK1/2.

Además, ConBr (1-6 h) indujo la fosforilación de CREB en su Ser133. Finalmente, observamos que tras la administración de ConBr, hubo un incremento en el ARNm de BDNF a las 12 h y en la proteína de BDNF a las 18-24 h. Estos resultados sugieren que la activación temprana de las proteincinasas PKA, AKT y ERK1, implicadas en la fosforilación de CREB Ser133, puede promover la transcripción de BDNF dependiente de CREB, lo que origina un incremento posterior de la proteína BDNF en respuesta a ConBr. Por tanto, ConBr podría actuar como una molécula multifuncional capaz de activar rutas de señalización implicadas en la plasticidad sináptica y la neuroprotección.

## 025.

### Sinergia protectora del CGP37157, el KB-R7943 y el RU360 asociada a los intercambiadores Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> de la mitocondria y de la membrana plasmática y al uniportador mitocondrial

C. Otalora-Miranda<sup>a,b</sup>, J.A. Arranz-Tagarro<sup>a,b,d</sup>, S.M. Nicolau<sup>a,b</sup>, E. Punzón-Fernández<sup>a,b</sup>, R. de Pascual-Castillo<sup>a,b</sup>, M. Maroto-Pérez<sup>a,b</sup>, E. Calvo-Gallardo<sup>a,b</sup>, A. García-García<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Universidad Autónoma de Madrid. <sup>b</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

<sup>c</sup>Servicio de Farmacología Clínica. Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital Universitario La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

<sup>d</sup>Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, A Coruña.

En los trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y, sobre todo, la enfermedad de Huntington, se han implicado la disfunción de la mitocondria y la alteración de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup>. La mitocondria capta Ca<sup>2+</sup> del citosol a través del uniportador (UP) y lo libera mediante el intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> mitocondrial (INCm),

ambos implicados en la circulación del Ca<sup>2+</sup> mitocondrial (CCm). Además, la modulación de la velocidad de esta CCm es un mecanismo de control de la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el citosol ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>), ya que, sobrepasado cierto umbral, la elevación de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> resulta tóxica y se desencadena la cascada de señalización de la apoptosis. En esta exquisita regulación para el mantenimiento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> dentro de niveles fisiológicos también interviene otro intercambiador, en este caso el de la membrana plasmática Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (INCmp), que transporta Na<sup>+</sup> al interior de la célula y saca Ca<sup>2+</sup> desde el citosol. Sin embargo, cuando el gradiente electroquímico del Na<sup>+</sup> se invierte, como sucede durante la despolarización de la membrana o la apertura de los canales de Na<sup>+</sup>, el intercambiador mueve Na<sup>+</sup> fuera de la célula y Ca<sup>2+</sup> al interior. En experimentos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, se ha comprobado que la regulación farmacológica de estos transportadores iónicos podría ser una buena estrategia enfocada en la neuroprotección frente al daño causado por un aumento de la concentración de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en el citosol. Para ello, se usaron como modelo rodajas de hipocampo de ratas de 2-3 meses de edad que fueron estresadas con 30 µM de veratridina, lo que produce una sobrecarga de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en el citosol, y tratadas con CGP 37157 (CGP), un bloqueador del INCm, y KB-R7943 (KBR), un bloqueador del INCmp, disminuyendo la salida masiva de Ca<sup>2+</sup> desde la mitocondria (CGP) y la entrada desde el espacio extracelular al citosol (KBR). En el protocolo empleado, se realizó una preincubación de los fármacos mencionados durante 30 minutos y, a continuación, una incubación de los fármacos junto con la veratridina durante 3,5 h. La viabilidad neuronal se midió empleando el método colorimétrico MTT y se observó que las rodajas tratadas con los compuestos presentaban una mayor supervivencia celular. Nuestro objetivo es investigar si seremos capaces de reproducir los resultados de neuroprotección mencionados anteriormente usando un protocolo diferente. En nuestro caso, no hacemos preincubación con los compuestos, si-

no que procedemos a provocar el estrés de las neuronas del hipocampo con 30 µM de veratridina durante una hora, tras la cual incubamos durante tres horas sólo con los compuestos, y observamos si el CGP o el KBR, ambos a concentraciones de 1, 3 y 10 µM, son capaces de revertir el daño causado por la veratridina. También estudiamos si la sinergia entre ambos compuestos producirá neuroprotección, y si ésta será mayor que la acción de cada compuesto por separado. Por otro lado, comprobamos el efecto que se produce al bloquear el UP con el compuesto RU 360, con la intención de que entre menos Ca<sup>2+</sup> a la mitocondria una vez producido el daño y tratando de evitar el aumento de la producción de especies reactivas, usando las mismas concentraciones que de los compuestos anteriores. También realizamos pruebas donde combinamos los compuestos CGP y RU, ambos a 3 µM, y, por otro lado, CGP, RU y KBR, todos a 1 µM.

## 026.

### El receptor nicotínico microglial α7-nAChR es un elemento clave para la neuroprotección mediante la inducción de HO-1 a través de Nrf2

E. Parada<sup>a,b</sup>, J. Egea<sup>a,b</sup>, I. Buendía<sup>a</sup>, P. Negrodo<sup>a,b,d</sup>, A.C. Cunha<sup>e</sup>, S. Cardoso<sup>e</sup>, M.P. Soares<sup>e</sup>, M. García-López<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>b</sup>Instituto Universitario La Paz-IDIPAZ. Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>c</sup>Instituto de Investigación Sanitaria.

Hospital Universitario La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>d</sup>Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

<sup>e</sup>Instituto Gulbenkian de Ciência. Oeiras, Portugal.

Nos preguntamos si el efecto neuroprotector de la estimulación colinérgica microglial durante un evento isquémico actúa a través de un mecanismo que implica la activación del factor nuclear Nrf2 o la expresión de su gen diana citoprotector, hemo oxi-

genasa-1 (HO-1, codificada por HMOX1). El efecto protector del PNU282987 –agonista del receptor  $\alpha 7$  nicotínico (nAChR  $\alpha 7$ )– se analizó en cultivos de hipocampo organotípicos (OHC) sometidos a privación de oxígeno y glucosa *in vitro*, así como en un modelo de isquemia por fototrombosis *in vivo*. La exposición de OHC a la privación de oxígeno y glucosa (OGD; 15 min), seguido por reoxigenación (24 h), provocó la muerte celular, medida por yoduro de propidio y tinción con MTT. La activación de  $\alpha 7$ -nAChR mediada por PNU282987 redujo la producción de especies reactivas de oxígeno y la liberación de TNF. Esto se asoció con la inducción de la expresión de HO-1, un efecto revertido por la bungarotoxina (BGT), inhibidor del  $\alpha 7$ -nAChR, así como por la protoporfirina (Sn) IX (SNPP), un inhibidor selectivo de la HO. El efecto protector de PNU282987 también se perdió en los OHC deplegados de microglía, así como en OHC de ratones Nrf2 deficiente (Nrf2<sup>-/-</sup>) frente a *wilde type* (Nrf2<sup>+/+</sup>), un efecto asociado con la supresión de HO-1 de expresión en microglía. La administración de PNU282987 una hora después de la inducción del ictus fototrombótico *in vivo*, redujo el tamaño del infarto y mejoró las capacidades motoras en ratones Hmox1lox/lox, que expresan niveles normales de HO-1, pero no en LysMCreHmox1Δ/Δ, en el que se inhibe la expresión de HO-1 específicamente en células mieloides, incluyendo la microglía. En conclusión, la activación de la vía  $\alpha 7$ -nAChR/Nrf2/HO-1 microglial regula la neuroinflamación y el estrés oxidativo que ofrezcan neuroprotección en condiciones de isquemia cerebral.

## 027.

### Papel neuroprotector del receptor nucleotídico P2Y13 frente al estrés genotóxico inducido por cisplatino en neuronas granulares de cerebelo

V. Morente-Rodríguez, R. Pérez-Sen, E. García-Delgado, M.T. Miras-Portugal

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

En las neuronas granulares de cerebelo, habíamos descrito el papel neuroprotector de los receptores de nucleótidos P2Y13 frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato, a través de la activación de la señalización de CREB dependiente de ERK1/2. En este trabajo, analizamos el posible efecto protector de estos receptores sobre otro tipo de estímulo apoptótico, como es el estrés genotóxico inducido por cisplatino, un fármaco usado en quimioterapia con importantes efectos secundarios en el sistema nervioso. De acuerdo con lo descrito en otros modelos celulares, el tratamiento con cisplatino condujo a la muerte por apoptosis de las neuronas granulares de manera dependiente de la activación de la caspasa-3. Profundizando en los mecanismos moleculares disparados por este tratamiento, se ha observado que la exposición a cisplatino conduce a una desregulación de la señalización de proteínas de la familia de las MAP cinasasa, lo cual conlleva la activación prolongada de las ERK1/2 y p38 hasta las 16-24 h, siendo el efecto más significativo en la p38. El patrón de sobreactivación de la p38 se correspondía con una disminución progresiva de la expresión de una proteína fosfatasa, la fosfatasa de especificidad dual Dusp2, selectiva para las formas fosforiladas de p38 y ERK1/2. El tratamiento previo con el agonista nucleotídico P2Y13, 2MeSADP, fue capaz de restablecer los niveles basales de la proteína fosforilada p38 después de la exposición a cisplatino, aumentando la supervivencia neuronal. Mediante diferentes abordajes experimentales, hemos identificado que la activación de los receptores P2Y13 induce la expresión de la proteína fosfatasa Dusp2, dependiente de la activación de la vía PI3K/ERK1/2. Este trabajo confirma la acción de los nucleótidos como importantes agentes neuroprotectores en las neuronas granulares de cerebelo, los cuales contribuyen a restaurar los mecanismos de *feedback* que operan en las cascadas de señalización dependientes de las proteínas MAP cinasasa.

## 028.

### Nuevos modelos de estrés mitocondrial para la búsqueda de fármacos neuroprotectores

E. Punzón-Fernández<sup>a</sup>, M. Maroto-Pérez<sup>a</sup>, J.F. Padín-Nogueira<sup>a</sup>, J.A. Arranz-Tagarro<sup>a</sup>, C. Otalora-Miranda<sup>a</sup>, A. García-García<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>b</sup>Servicio de Farmacología Clínica. Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital Universitario La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

La muerte neuronal por apoptosis se asocia a niveles anormales de calcio citosólico en combinación con el incremento de la sensibilidad al estrés oxidativo. La regulación de la homeostasia del calcio es muy importante para el correcto funcionamiento de la célula y, por tanto, debe mantenerse en un rango de concentraciones muy estrecho. Niveles bajos de calcio citosólico intervienen en multitud de procesos celulares; por ejemplo, la activación de calpaínas (proteasas que catalizan la hidrólisis de proteínas implicadas en la transducción de señales, la reconstrucción del citoesqueleto y la regulación del ciclo celular). Además, es el mensajero intracelular más importante de numerosos procesos fisiológicos. Por otro lado, niveles elevados de calcio citosólico son también perjudiciales, por ser una señal que desencadena la apoptosis celular. Ciertas evidencias sugieren que en las enfermedades neurodegenerativas se produce una entrada desmesurada de calcio al citosol, iniciando así la activación de cascadas de apoptosis. Esta sobrecarga de calcio se puede simular experimentalmente mediante el uso de determinados fármacos o soluciones iónicas, por ejemplo, el KCl y el FPL64176 (FPL) pueden producir una sobrecarga por apertura de canales de calcio dependientes de voltaje subtipo L. La oligomicina A y la rotenona pueden a su vez inducir el estrés oxidativo por inhibir la cadena mitocondrial de transporte de electrones en el complejo I (rotenona) y el complejo V (oligomicina A). En este sentido, nos planteamos como objetivos simular *in vitro*, en líneas celulares

de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y en cultivos celulares primarios de neuronas de hipocampo de embrión de rata, las condiciones de estrés celular por sobrecarga de calcio y daño oxidativo que acontecen en el marco de las enfermedades neurodegenerativas. Además, sobre estos protocolos de muerte celular, pretendemos verificar el efecto neuroprotector de fármacos conocidos y en fase experimental. En células de neuroblastoma, se ensayaron cinco protocolos de muerte celular, en donde el KCl (15 mM) y el FPL (0,1  $\mu$ M) se mantuvieron siempre constantes. Al primer protocolo, además de estos fármacos se añadió oligomicina A (1  $\mu$ M) y rotenona (0,3  $\mu$ M); al segundo, rotenona (1  $\mu$ M); al tercero, oligomicina A (1  $\mu$ M); al cuarto, rotenona (10  $\mu$ M), y al quinto, oligomicina A (10  $\mu$ M). Por otra parte, en los cultivos de neuronas probamos los siguientes protocolos: en el primero se ensayó con KCl (15 mM) y FPL (0,1  $\mu$ M); en el segundo, oligomicina A (10  $\mu$ M) y rotenona (30  $\mu$ M); en el tercero, rotenona (3  $\mu$ M), oligomicina A (0,3  $\mu$ M), KCl (10 mM) y FPL (0,1  $\mu$ M); en el cuarto, rotenona (30  $\mu$ M), KCl (10 mM) y FPL (0,1  $\mu$ M), y en el quinto, oligomicina A (3  $\mu$ M), KCl (10 mM) y FPL (0,1  $\mu$ M). Por último, probamos el efecto neuroprotector del nimodipino y del ITH12505 (análogo del CGP-37157), que actúan bloqueando la sobrecarga de calcio en el citosol y en la mitocondria, respectivamente. La galantamina, que inhibe la acetilcolinesterasa, y el resveratrol y la melatonina, por ser antioxidantes. Estos fármacos se preincubaron 30 min y, posteriormente, se realizó la coincubación con los protocolos de toxicidad propuestos durante 24 h. La viabilidad celular se determinó por bioluminiscencia mediante la técnica de la MTT. Se observaron diferencias entre los diferentes protocolos de toxicidad: aquellos en los que se utilizó oligomicina A mostraron mayor muerte celular que aquellos con rotenona. Estos resultados pueden deberse al bloqueo de la ATPasa, afectando en consecuencia la bioenergética celular. En cuanto a los fármacos neuroprotectores ensayados tanto solos como en combinación, no han conseguido revertir en su totalidad los efectos tóxicos de los protocolos ensayados.

## 029.

### Neuroprotección mediante la modulación farmacológica de la microglía en la patología de la enfermedad de Alzheimer: ¿una nueva diana?

I. Buendía-Abaitua<sup>a,b</sup>, J. Egea<sup>a,b</sup>,  
E. Parada<sup>a,b</sup>, E. Navarro<sup>a,b</sup>,  
M. García-López<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>b</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Se estima que hay unos 27 millones de personas con enfermedad de Alzheimer (EA) en el mundo y esta cifra podría aumentar a 107 millones en el año 2050 si no se obtienen tratamientos eficaces a corto plazo. En el cerebro *post mortem* de los pacientes con EA se aprecian dos características histopatológicas patognomónicas: las placas de  $\beta$ -amiloide y los ovillos neurofibrilares de proteína tau fosforilada. Además, hay un aumento del daño oxidativo, una disminución de factores de señalización neurotróficos, neuroinflamación y disregulación de la homeostasis de calcio neuronal. Pese a que se ha investigado mucho y existen diversas teorías sobre la etiopatogenia de la EA, sigue sin dilucidarse su causa, lo cual dificulta la obtención de tratamientos más efectivos. Los objetivos de este trabajo son: poner en marcha un modelo *in vitro* que reproduzca la patología de la EA asociando concentraciones subefectivas de  $\beta$ -amiloide y ácido okadaico ( $A\beta$ /AO) en cultivos organotípicos de hipocampo (COH) de rata; evaluar en este modelo el potencial efecto neuroprotector de la melatonina y el agonista  $\alpha 7$ -nAChR, PNU-282987; determinar la participación de la microglía en los procesos patológicos caracterizados en el modelo  $A\beta$ /AO; y explorar la presencia de procesos autofágicos en el modelo. La asociación de concentraciones subtóxicas de  $A\beta$ /AO indujo una toxicidad sinérgica en los cultivos organotípicos de hipocampo. Además, en este modelo  $A\beta$ /AO observamos otras ca-

racterísticas relacionadas con la patología de la EA, como son los agregados de  $A\beta$ , la hiperfosforilación de tau, alteraciones mitocondriales, incremento de marcadores inflamatorios, microgliosis y astrogliosis. Tanto la melatonina como el PNU282987 neuroprotegeron en este modelo de toxicidad que asocia  $A\beta$ /AO. La microglía desempeña un papel fundamental en la neurotoxicidad ocasionada por  $A\beta$ /AO, ya que en COH depletados de microglía no se observó toxicidad. Postulamos que una activación de autofagia microglial podría contribuir a proteger los COH ante las lesiones ocasionadas por la asociación  $A\beta$ /AO y, por tanto, este mecanismo podría suponer una nueva diana para el desarrollo de nuevos medicamentos para la EA.

### Sesión 5. Neurogénesis y neurodesarrollo

## 030.

### Posible implicación del sistema glutamatérgico en las etapas tempranas de la neurogénesis postisquémica de la zona subventricular de neonatos de rata

V. Bellver-Landete, E. Sánchez-Mendoza,  
M.P. González-González, C. Arce de Obieta, J. Merino, M.J. Oset-Gasque

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

Diversos grupos de investigación han indicado la importancia del glutamato en el proceso de neurogénesis de la zona subventricular (SVZ), tanto en condiciones normales, a lo largo de la corriente migratoria rostral, como en la migración a la corteza y estriado tras la lesión isquémica, a través de los receptores NMDA y mGluR5. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que los astrocitos del cuerpo calloso isquémico (CCI) pueden expresar los transportadores vesiculares de glutamato VGLUT2 y 3, lo que llevó a plantear la hipótesis de que estas células podrían estar libe-

rando glutamato y contribuyendo al proceso de neurogénesis inducido por la isquemia, actuando posiblemente sobre la proliferación, migración o supervivencia de neuroblastos. Para evaluar esta posibilidad, trabajos previos del grupo en un modelo de células progenitoras neurales (CPN) de la SVZ de neonatos de rata demostraron, mediante técnicas de RT-qPCR, *Western blot* e inmunocitoquímica, que la expresión de VGLUT1 y EAAT2 mostraba una tendencia ascendente a lo largo de los 10 días de diferenciación, mientras que la de EAAT1 se mantenía a niveles bajos y la de EAAT3 presentaba un pico de expresión a los cinco días de cultivo y una posterior reducción. Además, mediante inmunocitoquímica se observó que VGLUT1 está presente en neuroblastos, mientras que VGLUT2 y 3 se expresan preferentemente en células gliales. También resultados previos del grupo en CPN de la SVZ indicaron que el glutamato podría favorecer la diferenciación de las CPN al mismo tiempo que estimula su propia liberación en estas células a través de los VGLUT. Para determinar si esta función observada para el glutamato podría estar ocurriendo durante el proceso de isquemia cerebral, y puesto que en condiciones de ictus isquémico en humanos la SVZ no es afectada directamente por la isquemia, generamos medios condicionados en neuronas, astrocitos y células endoteliales a las que sometimos a privación de oxígeno y glucosa (POG) durante 4 h y a 12 h de reperusión, que se utilizaron para estimular las CPN durante 24 h, dejándolas posteriormente un tiempo de diferenciación de tres y seis días, y medimos la expresión de los transportadores de glutamato (VGLUT1-3 y EAAT1-3), así como la de genes de proliferación (nestina), migración (DCX) y diferenciación neuronal (B3T, NCAM, GFAP), mediante técnicas de RTq-PCR. Las CPN no respondieron de la misma forma al medio control que a los diferentes medios isquémicos. El medio de neuronas isquémicas (POGn) inhibió la expresión de VGLUT1 y 2 e incrementó la de EAAT2 y 3. También aumentó la expresión de DCX y de GFAP, pero no alteró la expresión de nestina, NCAM y B3T. Por el contrario, el medio de as-

trocitos isquémicos (POGa) indujo un incremento muy significativo en la expresión de VGLUT1-3 y de EAAT2, así como de DCX, pero no la de nestina, y también la de B3T y GFAP. Por último, el medio de células endoteliales isquémicas (POGe) indujo un incremento muy significativo en la expresión de VGLUT2-3, y también en la de EAAT2, e incrementó la expresión de DCX y nestina, así como la de B3T, pero no la de GFAP. Estos resultados, en conjunto, sugieren que tras la isquemia, todos los tipos celulares componentes de la unión neurovascular, las neuronas y, principalmente, los astrocitos reactivos y las células del endotelio vascular, enviarían señales a la SVZ que fomentarían la proliferación y migración de neuroblastos a la estructura lesionada. Estos resultados también apuntan la posibilidad de que los transportadores de glutamato VGLUT en CPN participen en dicho proceso y así puedan considerarse como una posible diana terapéutica en la isquemia.

## 031.

### Alteración de vías glutamatérgicas por exposición a contaminantes ambientales durante el desarrollo

E. Rodríguez-Farré, C. Suñol

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona. CSIC-IDIBAPS. CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Barcelona.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso de los vertebrados. Ejerce un papel fundamental en funciones cerebrales como la cognición, la memoria y el aprendizaje, aunque tiene efectos neurotóxicos cuando está presente en exceso. La concentración extracelular de glutamato se encuentra estrictamente regulada mediante diferentes transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) y sus efectos están mediados a través de la activación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato. Se postula que diversas sustancias químicas antropogénicas liberadas al medio ambiente poseen un papel clave en la aparición de manifestaciones subclí-

nicas de disfunción cerebral en la infancia, algunas de ellas probablemente relacionadas con la alteración de las vías glutamatérgicas. Mediante la utilización de neuronas cultivadas *in vitro* se han determinado los efectos de compuestos organoclorados –pertenecientes al grupo de los contaminantes orgánicos persistentes (COP)– sobre la expresión, localización y función de los receptores de glutamato, así como sobre la viabilidad celular. En estos cultivos primarios, las neuronas glutamatérgicas son más vulnerables que las gabérgicas frente a la exposición al dieltrín. Asimismo, el dieltrín, el  $\alpha$ -endosulfán y el lindano ( $\gamma$ -hexaclorociclohexano) incrementan la fosforilación de ERK1/2 (quinasas 1 y 2 reguladas por señales extracelulares) vía mecanismos que involucran a los receptores NMDA, GABA<sub>A</sub> y de estrógenos. La exposición de las neuronas en cultivo al dieltrín durante el período de diferenciación induce una regulación a la baja de la expresión de la subunidad NR2A del receptor NMDA y del receptor metabotrópico mGluR5, así como la interiorización de las subunidades NR1 y NR2B del receptor NMDA. Por otro lado, se ha determinado que los COP organoclorados estudiados y agentes organometálicos como el metilmercurio (contaminante ambiental ubicuo presente principalmente en el pescado) inhiben el transporte de glutamato por los EAAT, tanto en células neurales como no neurales. Del mismo modo, el transporte de glutamato también es inhibido por COP como los policlorobifenilos (PCB). Además, los PCB y el metilmercurio alteran las vías del glutamato mediadas por el receptor. En colaboración con el proyecto multicéntrico español INMA (Proyecto Infancia y Medio Ambiente: [www.proyectoinma.org](http://www.proyectoinma.org)) estamos estudiando la relación entre los niveles de glutamato en la sangre del cordón umbilical y la exposición al metilmercurio y compuestos organoclorados acumulados en placenta. El transporte de glutamato en estas placentas humanas es inhibido por el metilmercurio y por los organoclorados PCB y  $\beta$ -hexaclorociclohexano. Asimismo, los niveles de glutamato en sangre umbilical son inversamente proporcionales a

los de agentes organoclorados. Los efectos observados de los COP sobre los receptores y el transporte de glutamato llevan a una reducción de las funciones de las vías glutamatérgicas, que podrían relacionarse con los déficits cognitivos descritos en niños por diversos estudios epidemiológicos.

### 032.

#### Modelo unificado de la competencia neural de las células madre/progenitoras del tejido conectivo humano adulto

A. Pérez-San Vicente<sup>a</sup>, N. Gago-López<sup>a,h</sup>, U. Etxaniz-Irigoien<sup>a</sup>, M. García-Domínguez<sup>g</sup>, A. Aduriz<sup>f</sup>, H. Irizar<sup>b</sup>, M. Muñoz-Culla<sup>b</sup>, V. Pérez-López<sup>a</sup>, I. Burgoa<sup>a</sup>, I. Ezaguirre<sup>c</sup>, J.P. Sanz-Jaka<sup>d</sup>, J.J. Poza<sup>e</sup>, P. López-Mato<sup>f</sup>, D. Otaegui<sup>b</sup>, R. Maclellan<sup>b</sup>, A. Izeta<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Ingeniería Tisular. Área de Bioingeniería. <sup>b</sup>Área de Neurociencias. Instituto de Investigación Sanitaria Bionostia. Hospital Universitario Donostia. <sup>c</sup>Departamento de Cirugía Pediátrica. <sup>d</sup>Departamento de Urología. <sup>e</sup>Departamento de Neurología. Hospital Universitario Donostia. <sup>f</sup>Unidad de Citometría y Microscopía. Fundación Inbiomed. San Sebastián. <sup>g</sup>Laboratorio de Diferenciación Celular. Departamento de Células Madre. Centro Andaluz de Biología Molecular y Biomedicina Regenerativa (CABIMER). Sevilla. <sup>h</sup>División de Cardiología. Universidad del Washington Medical Center. Seattle, Estados Unidos.

En los últimos años se han publicado numerosos artículos que describen células precursoras neurales (NPC) residentes en varios tejidos adultos no neurales. En la actualidad, se desconoce el papel fisiológico de estas células y si sus propiedades reflejan propiedades intrínsecas *in situ* o, alternativamente, si se activan debido a daño tisular o a la manipulación *in vitro*. Las células precursoras de la piel –*skin-derived precursor cells* (SKP)– se describieron por primera vez como células dérmicas multipotentes derivadas de la cresta neural de función desconocida. Posteriormente, se estableció una relación leve entre las células troncales dérmicas Sox2 positivas (residentes en la papila dérmica del folículo piloso) y las SKP. En este trabajo se estudia el origen de las NPC dérmicas humanas en edad adulta. Tras el análisis no sesgado de identificación

de linajes celulares determinando la expresión de 242 proteínas de superficie, fraccionamiento celular (*cell sorting*), caracterización transcriptómica y análisis de migración *in vivo*, se ha demostrado que las células troncales/precursoras Sox2+ presentes en piel humana del tronco se asocian a los linajes de Schwann y de pericitos, linajes que podrían estar interrelacionados. Además, la subpoblación asociada al linaje de Schwann es la única responsable de la capacidad de diferenciación neural mostrada por las SKP (incremento > 100 veces). Estas NPC se obtuvieron también del estroma del corazón, reforzando nuestra hipótesis de que los precursores residentes Sox2+ podrían extenderse al tejido conectivo de múltiples órganos. Con ello, proponemos un modelo unificado por el cual la desdiferenciación de células de Schwann de las terminaciones nerviosas periféricas induce la competencia neural de estos precursores residentes preexistentes, siendo dependiente de los niveles de expresión de Sox2.

#### Sesión 6. Modelos de enfermedad: Alzheimer, Parkinson, enfermedades neuromusculares

### 033.

#### Desarrollo de un modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer basado en la neuroinflamación y la lesión mitocondrial

E. Navarro-González de Mesa, I. Buendía, E. Parada, J. Egea, M. García-López

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo cuyas características patofisiológicas más relevantes son los acúmulos de la proteína  $\beta$ -amiloide y la proteína tau hiperfosforilada. Sin embargo, el análisis *post mortem* del cerebro de pa-

cientes con EA revela que adicionalmente existe una situación inflamatoria persistente y una disfunción mitocondrial, que podrían desempeñar un papel activo en el desarrollo y evolución de la patología. Basándonos en estos hechos, hemos puesto a punto un modelo para el estudio de la EA en cultivo organotípico de hipocampo de rata empleando 1 ng/mL del agente proinflamatorio LPS (lipopolisacárido bacteriano) y 0,1  $\mu$ M del bloqueante mitocondrial antimicina A. Ambos estímulos por sí solos ocasionan un incremento de la toxicidad de alrededor del 15-20%, mientras que su asociación produce una respuesta sinérgica con niveles de muerte de alrededor del 50%. Se analizaron diversos parámetros para la caracterización del modelo, determinándose que la combinación de LPS y antimicina A ocasionó un aumento de la despolarización mitocondrial y un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que se traduce en una alteración de la función mitocondrial y una situación de estrés oxidativo. También observamos una tendencia a la activación de células microgliales, aunque no se observaron alteraciones en la morfología astrocitaria. Finalmente, la asociación de ambos estímulos conduce a la aparición de una patología tipo Alzheimer, ya que produce acumulación significativa de placas de la proteína  $\beta$ -amiloide visualizada como un incremento de tioflavina-S, así como una tendencia a incrementar la hiperfosforilación de la proteína tau medida por *Western blot*. Adicionalmente, se ha empleado el presente modelo para el estudio de compuestos potencialmente neuroprotectores, como es el caso del agonista nicotínico  $\alpha 7$  PNU282987, el activador de Nrf2 sulforafano o la hormona melatonina, obteniéndose que los tres compuestos son capaces de prevenir la neurotoxicidad inducida por la neuroinflamación y la lesión mitocondrial. En resumen, hemos establecido un modelo *in vitro* de neurodegeneración de utilidad para estudiar la interacción entre neuroinflamación y lesión mitocondrial en la cascada patológica de la EA, así como para la evaluación de nuevos compuestos con un potencial perfil neuroprotector.

## 034.

### Discinesias en el modelo animal de enfermedad de Parkinson de la rata lesionada unilateralmente con 6-OHDA: efecto de la quetiapina

B. Gago<sup>a,d</sup>, C. Marín<sup>d,e</sup>, D. García-García<sup>d,f</sup>, H. Jiménez-Urbieta<sup>a</sup>, V. Gómez-Vallejo<sup>c</sup>, J. Llop<sup>c</sup>, M.C. Rodríguez-Oroz<sup>a,b,d,g</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia. San Sebastián. <sup>b</sup>Departamento de Neurología. Hospital Universitario Donostia. San Sebastián. <sup>c</sup>Unidad de Imagen Molecular. CICbiomaGUNE. San Sebastián. <sup>d</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Madrid. <sup>e</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona. <sup>f</sup>Centro de Investigación Médica Aplicada. Pamplona. <sup>g</sup>Fundación Ikerbasque. Bilbao.

El desarrollo de complicaciones motoras y no motoras inducidas por fármacos (discinesias y trastorno del control de impulsos) complican a largo plazo el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP). Existen evidencias que sugieren que los receptores serotoninérgicos, en especial el subtipo 2A (5-HT<sub>2A</sub>), podrían estar involucrados en el inicio y desarrollo de las discinesias. Así, se ha descrito un incremento de la expresión de estos receptores 5-HT<sub>2A</sub> en el estriado de monos parkinsonianos (lesionados con MPTP). Debido a esto, se han desarrollado trabajos con fármacos antipsicóticos como la quetiapina (neuroleptico atípico) que muestran que reduce las discinesias inducidas por levodopa en monos parkinsonianos y en ensayos en pacientes con EP. Este fármaco es un antagonista no selectivo de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, aunque tiene afinidad por otros receptores serotoninérgicos y dopaminérgicos (D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>), por lo que la contribución específica de cada tipo de receptores no está clara. Su identificación podría determinar posibles rutas de interés terapéutico. Ratas lesionadas con el neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA), tratadas con el agonista dopaminérgico apomorfina, desarrollan movimientos anormales involuntarios que remedan a las discinesias en los pacientes. Hemos usado este modelo experimental de EP con

discinesias para analizar el efecto de la quetiapina sobre las discinesias, mediante estudios de comportamiento, y sobre el metabolismo cerebral *in vivo*, mediante estudios de tomografía por emisión de positrones (PET). Los animales fueron lesionados con 6-OHDA y tratados durante dos semanas usando un protocolo de incremento de dosis cada cinco días (0,1, 0,2, 0,5 mg/kg, subcutáneo). El 16.<sup>o</sup> día se coadministró a los animales apomorfina y quetiapina durante dos semanas. Se valoraron los movimientos anormales involuntarios y el comportamiento rotacional en los días 1, 5, 6, 10, 11, 15, 16, 20, 25 y 30 del tratamiento. Una vez finalizado el análisis comportamental, se llevaron a cabo los estudios mediante PET con los radioligandos 18F-FDG (metabolismo) y 11C-PE2I (marcador del transportador de dopamina), bajo efecto de los fármacos. La quetiapina redujo el número de rotaciones inducidas por la apomorfina en comparación con el grupo tratado sólo con el agonista dopaminérgico, lo que indica un efecto inhibitorio de la quetiapina sobre los receptores dopaminérgicos. Sin embargo, los animales tratados con quetiapina mostraron un incremento en la puntuación de movimientos anormales involuntarios, que podría ser la consecuencia de la disminución en el comportamiento rotacional o la combinación de la acción inespecífica de la quetiapina sobre distintos tipos de receptores. Los estudios de PET muestran una asociación entre el grado de discinesias que muestran los animales de los distintos grupos experimentales y un hipometabolismo en el estriado contralateral del lado que sufre la depleción dopaminérgica, lo que sugiere una relación entre la actividad de este núcleo y la expresión de los movimientos anormales involuntarios.

## 035.

### La activación selectiva de la subunidad $\alpha 7$ de los receptores nicotínicos para la acetilcolina reduce la inflamación y mejora la regeneración muscular en el modelo mdx de la distrofia muscular de Duchenne

C. Pérez de Nanclares<sup>a</sup>, I. Colmena<sup>a</sup>, R. de Pascual<sup>a</sup>, P.E.C. Leite<sup>b</sup>, W.C. Santos<sup>b</sup>, L. Gandía<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. <sup>b</sup>Departamento de Biología Celular y Molecular. Universidad Federal Fluminense. Niteroi, RJ, Brasil.

La activación de la subunidad  $\alpha 7$  de los receptores nicotínicos para la acetilcolina (nACh $\alpha 7$ R) reduce la inflamación. Esta regulación está producida por la activación del reflejo inflamatorio, también conocido como 'vía colinérgica antiinflamatoria'. Esta vía es dependiente de la estimulación del nervio vago, originando la liberación de acetilcolina (ACh) en los órganos diana. Como resultado, se produce la inhibición de las señales inflamatorias y de la secreción de citocinas. Los ratones mdx (un modelo de distrofia muscular de Duchenne desarrollan una miopatía de carácter inflamatorio poco después de su destete. Esta miopatía se caracteriza por la presencia de una mionecrosis, seguida de un proceso de regeneración muscular y de fibrosis en una edad más avanzada. Pretendemos caracterizar la posible implicación de los nACh $\alpha 7$ R en los procesos inflamatorios que se observan en este modelo animal durante el desarrollo de su proceso distrófico. Hemos utilizado ratones mdx, ratones *knock out* nACh $\alpha 7$ R<sup>(-/-)</sup> y sus correspondientes ratones controles C57BL10. Los animales fueron tratados intraperitonealmente con el agonista selectivo para el nACh $\alpha 7$ R PNU282987 (PNU28) y con el antagonista metilcaconitina (MLA). Se caracterizó la actividad de las metaloproteasas (MMP) 2 y 9 mediante zimografía. Para el estudio de la liberación de la citocina TNF $\alpha$  se utilizó la técnica de ELISA, *Western blot* para la activación de NF $\kappa$ B y análisis morfométricos para determinar las áreas de lesión y de posible regeneración. Hemos observado que el ratón mdx desarrolla una miopatía inflamatoria caracterizada por una progresiva degeneración de las fibras musculares esqueléticas y posterior reemplazamiento por tejido conectivo. Se observa una inflamación

del músculo esquelético, que puede atenuarse mediante la activación de los nACh $\alpha 7$ R. Esta disminución de la inflamación se caracteriza por una menor actividad de MMP-9, liberación de TNF $\alpha$ , activación de NF $\kappa$ B y disminución del área de lesión. Además, hemos observado que la activación de los nACh $\alpha 7$ R promueve la regeneración muscular en los ratones mdx sin afectar el depósito de colágeno no funcional. Estos resultados están respaldados por la imposibilidad de reducir la inflamación en el músculo esquelético en ratones nACh $\alpha 7$ R<sup>(-/-)</sup> a los que se les ha producido una lesión muscular y han sido tratados con el agonista selectivo nACh $\alpha 7$ R PNU28, en contraste con lo obtenido en ratones controles nACh $\alpha 7$ R<sup>(+/+)</sup>. Estos datos sugieren que la activación selectiva de los nACh $\alpha 7$ R podría ser una estrategia terapéutica novedosa en la reducción de la inflamación del músculo esquelético en el modelo mdx de distrofia muscular de Duchenne y, posiblemente, para otras enfermedades inflamatorias a través de un mecanismo colinérgico.

## 036.

### Efecto del S107 y A6 en miotubos humanos distróficos

I. Toral-Ojeda<sup>a,c</sup>, G. Aldanondo<sup>a</sup>, P. Ferrón<sup>b</sup>, J.I. Miranda<sup>b</sup>, J.M. Aizpurúa<sup>b</sup>, A. López de Munain-Arregui<sup>a,c</sup>, A. Vallejo-Illarramendi<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Neurociencias. Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia. Hospital Universitario Donostia. San Sebastián. <sup>b</sup>Facultad de Químicas. Universidad del País Vasco. San Sebastián. <sup>c</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Madrid.

Las distrofias musculares se caracterizan por atrofia primaria del músculo esquelético, lo que afecta la movilidad del paciente y puede conducir a una parálisis y muerte prematura. La alteración en el transporte de calcio es un factor que contribuye al fenotipo clínico de la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Un estudio reciente en ratones mdx, modelo de esta distrofia, describe una nitrosilación anormal del receptor de rianodina 1 (RYR1), que provoca la depleción de

calstabin-1 del complejo y ello origina fugas de calcio de los canales de RyR1. El tratamiento de estos ratones con el estabilizador de RyR1, S107, evita la depleción de calstabin-1, inhibe la pérdida de calcio del retículo sarcoplásmico y reduce la evidencia bioquímica e histológica de daño muscular, mejorando la función muscular y el rendimiento durante el ejercicio. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha testado el efecto del S107 en muestras humanas *in vitro*. Hemos analizado el efecto del S107 y otro estabilizador del RyR1 (A6) en distintos modelos celulares de DMD: miotubos primarios inmortalizados, miotubos derivados de fibroblastos y miotubos innervados con explantes de médula espinal de rata. Se encontró que concentraciones de S107 de hasta 100  $\mu$ M no son tóxicas para estas células, aunque el tratamiento con 1 mM de S107 durante 24 h originó el 100% de muerte celular. Por contra, el compuesto A6 no es tóxico incluso en altas concentraciones. Además, hemos utilizado el modelo de choque hipotónico para simular un estrés mecánico en estas células. En dicho modelo, hemos analizado el incremento del calcio intracelular, la entrada de *Evans blue*, la liberación de calceína, lactato deshidrogenasa y creatininas, y los niveles de estrés oxidativo y estrés mitocondrial. Hemos hallado que concentraciones de 150 nM de S107 y A6 aumentan la resistencia de los miotubos deficientes en distrofina frente al daño mecánico. Los resultados obtenidos en nuestro modelo celular humano están en línea con los alcanzados en ratones tratados con S107 y sugieren que tanto este fármaco como el compuesto A6 podrían ser candidatos adecuados para un ensayo clínico en pacientes con DMD.

### 037.

#### Efecto de nuevos moduladores del receptor de rianodina en modelos animales de distrofia muscular

G. Aldanondo<sup>a</sup>, I. Toral-Ojeda<sup>a,c</sup>, P. Ferrón<sup>b</sup>, J.I. Miranda<sup>b</sup>, J.M. Aizpurúa<sup>b</sup>, A. López de Munain-Arregui<sup>a,c</sup>, A. Vallejo-Illarramendi<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Neurociencias. Instituto de Investigación Sanitaria BIODONOSTIA. Hospital Universitario Donostia. San Sebastián. <sup>b</sup>Facultad de Químicas. Universidad del País Vasco. San Sebastián. <sup>c</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Madrid.

En modelos murinos de distrofia muscular de Duchenne (ratón mdx) y LGM-D2E, se ha identificado una nitrosilación anormal del receptor de rianodina (RyR1), lo que provoca la depleción de calstabin 1 del complejo macromolecular, traducándose en una pérdida anormal del calcio del retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma. El tratamiento de estos ratones con el S107, un estabilizador de RyR1, previene la depleción de la calstabin 1 y aumenta su afinidad de unión al RyR1, reduciendo tanto la pérdida de calcio del retículo como el daño muscular en estos animales. Presentamos los datos obtenidos de un ensayo de 10 días en ratones mdx, donde hemos evaluado el efecto del S107 y otros dos compuestos originales de bajo peso molecular (A6 y A7) capaces de actuar sobre la interacción calstabin-1/RyR. El daño muscular se evaluó mediante el estudio histológico de los músculos tibial anterior, gastrocnemio y diafragma. En particular, se evaluó el daño celular mediante el análisis de la captación de *Evans blue*, el porcentaje de núcleos centrales y la varianza del diámetro mínimo de Feret. Se analizó la fibrosis e infiltración de colágeno mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. Los resultados de este estudio son prometedores y apuntan a que los compuestos Ahulken mejoran los signos histológicos de daño muscular en los ratones mdx. Actualmente, estamos diseñando un ensayo de 30 días de duración que engloba un mayor número de ratones, para obtener resultados con significación estadística. En conclusión, la modulación de la unión entre RyR1 y la calstabin ha resultado ser una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de las enfermedades que afectan a la contracción muscular. De confirmarse nuestros resultados, nos encontraríamos ante unos posibles futuros fármacos que abrirían una nueva vía en el tratamiento de las enfermedades musculares.

### 038.

#### Un nuevo sistema *in vitro* para generación de músculo esquelético combinando células precursoras dérmicas y matrices extracelulares

P. García-Parra<sup>a,b,d</sup>, M. Maroto-Pérez<sup>d</sup>, N. Naldaiz-Gastesi<sup>a,b</sup>, M. Goicoechea<sup>b</sup>, A. Aiaitui<sup>b</sup>, J.F. Padín-Nogueira<sup>d</sup>, J.C. Fernández-Morales<sup>d</sup>, J. Lacalle-Prieto<sup>a,b</sup>, P. García-Belda<sup>e</sup>, J.M. García-Verdugo<sup>e</sup>, A. García-García<sup>d</sup>, A. Izeta<sup>a</sup>, A. López de Munain-Arregui<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Ingeniería Tisular. Departamento de Bioingeniería. Instituto de Investigación Sanitaria BIODONOSTIA. Hospital Universitario Donostia. San Sebastián. <sup>b</sup>Departamento de Neurociencias-CIBERNED. Instituto de Investigación Sanitaria BIODONOSTIA. Hospital Universitario Donostia. San Sebastián. <sup>c</sup>Departamento de Neurociencia. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco. San Sebastián. <sup>d</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. <sup>e</sup>Laboratorio de Neurobiología Comparada-CIBERNED. Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Universidad de Valencia. Valencia.

Inicialmente, las células precursoras derivadas de la piel –*skin-derived precursor cells* (SKP)– se describieron como una población de células precursoras derivadas de la cresta neural presentes en la dermis de mamíferos adultos. Esta población de células multipotentes presenta capacidad de diferenciación clonal y de diferenciación en células tanto de estirpe neural como mesodérmica (neuronas, células gliales y células musculares lisas). Debido a que no existen riesgos significativos durante la obtención de biopsias de piel y a que estas células precursoras no requieren condiciones especiales de cultivo, las SKP se consideran desde un punto de vista clínico como una fuente celular accesible y muy interesante para su aplicación en terapia regenerativa basada en células precursoras. A día de hoy, únicamente Qiu et al (2010) han descrito la capacidad de SKP derivadas de piel de ratones neonatos de generar progenitores musculares Pax7+ Myf5+, capaces de diferenciarse en células musculares esqueléticas. Durante más de cuatro años, nuestro grupo ha

estado trabajando con SKP y, recientemente, hemos conseguido derivar SKP procedentes de roedores adultos a músculo esquelético funcional de una manera altamente eficiente mediante el uso de una nueva matriz extracelular (ECM). Las ECM son polímeros complejos que desempeñan un papel muy importante en distintos procesos celulares como la adhesión, la proliferación, la diferenciación y, en última instancia, en el mantenimiento de la homeostasis del tejido. Concretamente, la ECM proporciona señales tróficas y de señalización que las células musculares necesitan para su supervivencia, desarrollo e integración. Por tanto, la capacidad de recrear el microambiente muscular *in vitro* resulta de vital importancia para entender el comportamiento de las células musculares y su funcionalidad *in vivo*. En nuestro trabajo, las células aisladas de piel de ratones adultos se mantuvieron durante una semana en condiciones de proliferación no adherentes, con la consecuente formación de dermoesferas enriquecidas en SKP. A continuación, estas dermoesferas se transfirieron a la ECM para su inducción miogénica. Bajo la influencia de nuestra ECM, se ha observado la formación de miotubos multinucleados, estriados y contráctiles en menos de siete días de cultivo. La naturaleza de estos miotubos se ha caracterizado mediante inmunofluorescencia, RT-qPCR y WB, confirmando la expresión de marcadores específicos relacionados con el desarrollo músculo-esquelético y no músculo-cardíaco (p. ej., miogenina, MyHC, TnT y RyR1, pero no RyR2 ni TNNT3, que son específicos de músculo cardíaco). Una caracterización ultraestructural más detallada se encuentra actualmente en curso. Además, se han analizado las propiedades electrofisiológicas de los miotubos contráctiles mediante *whole-cell patch-clamp* y medidas de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico, tanto en ausencia como en presencia de d-tubocurarina y nifedipino. Las corrientes inducidas por acetilcolina en diferentes tampones (carentes de  $Na^+$  o  $Ca^{2+}$ ) han revelado el papel principal de los iones  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  en la función contráctil de las fibras. Además, mediante ambas técnicas, se ha observado el efecto inhibitorio de la d-tubocurarina, pero no del nifedipino,

en miotubos estimulados con acetilcolina, lo que ha corroborado la naturaleza esquelética de los miotubos contráctiles. Finalmente, al comparar nuestro sistema de diferenciación muscular *in vitro* con el previamente publicado por Qiu et al, se ha observado una clara ventaja cuantitativa, cualitativa y funcional de nuestro sistema basado en el cultivo sobre ECM. Concluimos, por tanto, que la diferenciación *in vitro* de fibras músculo-esqueléticas a partir de SKP se mejora mediante el uso de una ECM natural como sustrato. Este sistema podría tener una aplicación directa en la modelización de distintas enfermedades neuromusculares, lo que abre la posibilidad de ensayar distintas terapias farmacológicas a alta velocidad y alto rendimiento.

### 039.

#### Aplicación de un nuevo sistema *in vitro* para el modelaje de enfermedades neuromusculares

N. Naldaiz-Gastesi<sup>a,b</sup>, M. Maroto-Pérez<sup>d</sup>, E. Calvo-Gallardo<sup>d</sup>, J. Lacalle-Prieto<sup>a,b</sup>, J.F. Padín-Nogueira<sup>d</sup>, J.C. Fernández-Morales<sup>d</sup>, A. García-García<sup>d</sup>, A. Izeta<sup>a</sup>, A. López de Munain-Arregui<sup>b,c</sup>, P. García-Parra<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Ingeniería Tisular. Departamento de Bioingeniería. Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia. Hospital Universitario Donostia. San Sebastián. <sup>b</sup>Departamento de Neurociencias-CIBERNED. Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia. Hospital Universitario Donostia. San Sebastián. <sup>c</sup>Departamento de Neurociencia. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco. San Sebastián. <sup>d</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica. Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Las enfermedades neuromusculares (ENM) constituyen un conjunto de más de 150 patologías de naturaleza progresiva que afectan a uno de los constituyentes de la unidad motora, ya sea la motoneurona espinal, el nervio periférico, la unión neuromuscular o la fibra muscular propiamente dicha. Las ENM tienen causas muy diferentes, siendo las principales las genéticas o hereditarias y las adquiridas, y dentro de estas últimas, las de origen inmunológico, las de origen in-

feccioso (vírico, bacteriano o parasitario), las de origen tóxico-medicamentoso y, por último, las de origen endocrinometabólico. Su aparición puede producirse en cualquier etapa de la vida y su principal característica clínica es la debilidad y la atrofia muscular. Las ENM se encuentran agrupadas dentro de las denominadas enfermedades raras y algunas de ellas son multisistémicas, pudiendo afectar a otros órganos como el cerebro o el corazón. En cifras globales, existen más de 50.000 afectados por ENM en toda España. Las distrofias musculares, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la distrofia miotónica de Steinert son ejemplos de ENM. Actualmente, no se dispone de un tratamiento etiológico en la mayoría de las ENM de base genética, pero existe una investigación muy activa que pretende determinar y controlar los procesos patológicos de estas enfermedades, así como diseñar nuevas terapias y tratamientos para ellas. A tal fin, existen diversos modelos animales de diferentes ENM como, por ejemplo, ratones C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J como modelo de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) o ratones B6.Cg-Tg(SOD1G93A)1Gur-J como modelo de la ELA. Sin embargo, y a pesar de constituir una herramienta muy útil, los modelos animales presentan una serie de limitaciones como son las diferencias clínicas y bioquímicas que presentan con respecto a la patología en humanos, la posibilidad del rechazo inmunológico y el elevado coste, lo que limita su utilidad en el ensayo de nuevas terapias y hace patente la necesidad de diseñar nuevos sistemas alternativos que permitan estudiar y modelar las ENM. Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado un nuevo y eficiente sistema para generar músculo esquelético funcional *in vitro* a partir de células precursoras derivadas de la piel, gracias a la utilización de una matriz extracelular natural que actúa como un soporte polimérico activo. En esta línea, el objetivo de este trabajo es aplicar este nuevo modelo muscular *in vitro* al estudio de distintas ENM como la DMD o la ELA. Resultados preliminares muestran la posibilidad de obtener unos robustos cultivos de miotubos multi-

nucleados pulsátiles de células precursoras aisladas a partir de la piel de ratones C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J y B6.Cg-Tg(SOD1G93A)1Gur-J, cultivadas en la matriz extracelular desarrollada previamente. Al igual que en los casos control, se ha observado que estos miotubos patológicos presentan estriaciones y marcadores miogénicos (MyoD, miogenina, MyHC, TnT) característicos de un músculo esquelético funcional. Sin embargo, resulta imprescindible determinar y valorar aquellas características, tanto morfológicas como funcionales, que definen y diferencien estos miotubos patológicos de sus respectivos controles. De forma preliminar, podemos concluir que el modelo muscular *in vitro* desarrollado en nuestro laboratorio es reproducible en casos de patología neuromuscular. Siguiendo con esta línea de trabajo, el objetivo final será extrapolar los resultados obtenidos al modelo de patología neuromuscular humana.

### 040.

#### Búsqueda de mutaciones en ciliopatías de la retina

A. Anasagasti-Viteri<sup>b</sup>, C. Irigoien<sup>c</sup>, O. Barandika<sup>b</sup>, A. López de Munain-Arregui<sup>a,b,d,e</sup>, J. Ruiz-Ederra<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Madrid. <sup>b</sup>Departamento de Neurociencias. Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia. <sup>c</sup>Departamento de Oftalmología. <sup>d</sup>Departamento de Neurología. Hospital Universitario Donostia. <sup>e</sup>Departamento de Neurociencia. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco. San Sebastián.

Los cilios primarios son apéndices del citoplasma celular evolutivamente conservados entre diferentes especies de vertebrados. Estudios recientes han demostrado su importante papel en la señalización y comunicación intercelular actuando como 'antena' de la célula para captar señales del entorno. Dado que los cilios son estructuras presentes en casi todos los tipos celulares de los vertebrados, los defectos en la formación o en la función de los cilios se ha correlacionado con enfermedades de fenotipos

muy diversos, agrupados en una creciente lista de trastornos genéticos conocidos colectivamente como ciliopatías. Entre estos fenotipos tan dispares se incluyen enfermedad renal, diabetes, obesidad, anomalías cerebrales, fibroquística congénita del hígado y displasias. Estas ciliopatías están implicadas también en el desarrollo de enfermedades genéticas retinianas como la distrofia de conos, la distrofia de conos y bastones, la amaurosis congénita de Leber y el síndrome de Usher o de Bardet-Biedl, en el que un mismo paciente puede llegar a sufrir conjuntamente retinitis pigmentosa, obesidad, deterioro cognitivo, polidactilia, hipogonadismo y enfermedad renal. Dentro de las células fotorreceptoras de la retina existe una estructura altamente especializada denominada cilio conector; se trata de un cilio primario modificado en estructura y funciones. Esta estructura se sitúa en una zona central del fotorreceptor y supone una zona limitante para el transporte de moléculas debido a su reducido tamaño. Este cilio conector es clave en el transporte bidireccional de las proteínas implicadas en el proceso de fototransducción de la señal luminica. Se han descrito hasta la fecha mutaciones en 21 genes de las proteínas ciliares implicadas en el desarrollo de distrofias retinianas. La caracterización genético-molecular de los pacientes con estas alteraciones en la retina permitirá desarrollar nuevos abordajes terapéuticos basados en la terapia génica. Hemos utilizado una estrategia de búsqueda de mutaciones basada en el análisis de alta resolución de la variación en la temperatura de desnaturalización de la doble hebra de ADN o análisis de *high resolution melting*. A pesar de que las ciliopatías se caracterizan por una genética muy compleja, esta técnica ha resultado muy eficaz para la detección de mutaciones de genes asociados al desarrollo de enfermedades con características clínicas bien determinadas, como es el síndrome de Bardet-Biedl. Esta metodología de trabajo ha permitido detectar mutaciones que podrían explicar la patogenia en tres de un total de cinco pacientes afectados por dicho síndrome.