

ÍNDICE

Conferencias plenarias 1051

The interaction of activity and neurotrophic factors in the development of motoneurons 1051
RONALD W. OPPENHEIM (*Winston Salem, NC, USA*)

GFL neurotrophic factors: mode of action, biological function and clinical potential 1051
EUGENE M. JOHNSON JR. (*St. Louis, MO, USA*)

Simposios 1051

S1. Corteza prefrontal y trastornos psiquiátricos 1051
COORDINADOR: FRANCESC ARTIGAS (*Barcelona*)

Ponentes:

Alteraciones prefrontales en esquizofrenia 1051
VÍCTOR PÉREZ SOLA (*Barcelona*)

Conectividad de la corteza prefrontal 1051
CARMEN CAVADA (*Madrid*)

Role of dopamine transmission in prefrontal function 1052
ANNE MARIE THIERRY (*Paris*)

Modulación de la actividad de las neuronas de corteza prefrontal por serotonina. Relevancia terapéutica 1052
FRANCESC ARTIGAS (*Barcelona*)

S2. Papel de los sistemas cannabinoide y dopaminérgico en la adicción 1052
COORDINADOR: RAFAEL MALDONADO (*Barcelona*)

Ponentes:

D₃ receptors (D₃R) and drug-conditioned responses: partial agonists or antagonists? 1052
PIERRE SOKOLOFF (*Paris*)

Papel de los receptores dopaminérgicos en la adicción a cannabinoides 1052
ROSARIO MORATALLA (*Madrid*)

Papel del sistema endocannabinoide en la dependencia de nicotina 1053
OLGA VALVERDE (*Barcelona*)

Papel del sistema endocannabinoide en la recaída a la adicción a alcohol 1053
FERNANDO RODRÍGUEZ DE FONSECA (*Málaga*)

S3. Muerte celular programada durante el desarrollo del sistema nervioso 1053
COORDINADOR: ENRIQUE J. DE LA ROSA (*Madrid*)

Ponentes:

Control of cell survival during axonal guidance in the *Drosophila* CNS 1053
PETER MCQUILTON (*Cambridge*)

Molecular regulation of cell death during inner ear development: IGF-I roles 1053
YOLANDA LEÓN (*Madrid*)

The role of TGF- β in the regulation of programmed cell death 1053
KERSTIN KRIEGLSTEIN (*Gottingen*)

Role and regulation of programmed cell death during early neural development 1054
ENRIQUE J. DE LA ROSA (*Madrid*)

S4. Mecanismos celulares y moleculares de la degeneración neuronal en la esclerosis lateral amiotrófica 1054
COORDINADOR: JORDI CALDERÓ (*Lleida*)

Ponentes:

The development of motoneurons rescued from PCD by genetic deletion of the pro-apoptotic gene Bax 1054
RONALD W. OPPENHEIM (*Winston Salem, NC, USA*)

Potential role of motoneuron-specific cell death pathways in neurodegeneration in ALS 1054
CHRISTOPHER E. HENDERSON (*Marseille, France*)

Excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis 1054
WIM ROBBERECHT (*Leuven, Belgium*)

Acumulación de proteínas en el retículo endoplasmático como una alteración temprana y selectiva en las motoneuronas después de un estímulo glutamatérgico crónico no letal 1055
JORDI CALDERÓ (*Lleida*)

S5. Calcio y función neuronal 1055
COORDINADOR: JAVIER GARCÍA-SANCHO (*Valladolid*)

Ponentes:

Intra-ER calcium dynamics and neuronal signalling 1055
ALEXEI VERKHRATSKY (*Manchester, UK*)

Regulación génica por calcio:
aspectos funcionales del represor DREAM 1055
JOSÉ RAMÓN NARANJO (*Madrid*)

Calcio y transducción sensorial 1055
FÉLIX VIANA (*Alicante*)

Calcio y neuroprotección farmacológica 1056
MERCEDES VILARROYA (*Madrid*)

Participación de las mitocondrias en la señal de calcio 1056
JAVIER GARCÍA-SANCHO (*Valladolid*)

**S6. Terapias celular y génica
en las enfermedades neurodegenerativas** 1056
COORDINADOR: JOSÉ LÓPEZ BARNEO (*Sevilla*)

Ponentes:

Factores neurotróficos y terapias celulares
en enfermedades neurodegenerativas 1056
JUAN JOSÉ TOLEDO ARAL (*Sevilla*)

Diferenciación de células madre neurales 1056
CARLOS VICARIO (*Madrid*)

Inducción de neuronas dopaminérgicas
a partir de precursores neuronales y de células madre 1057
ERNEST ARENAS (*Stockholm, Sweden*)

Transferencia *in vivo* a neuronas de Purkinje
usando amplicones de herpes simple I 1057
FRANCISCO WANDOSELL (*Madrid*)

**S7. Mecanismos moleculares
en la muerte neuronal apoptótica** 1057
COORDINADOR: VALENTÍN CEÑA (*Albacete*)

Ponentes:

Cell cycle and neuronal death 1057
FERDINANDO NICOLETTI (*Catania, Italy*)

Mecanismos implicados en la muerte
neuronal apoptótica por ceramida 1057
JOSÉ RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ (*Barcelona*)

Regulación de la expresión de la pentraxina
neuronal durante el proceso de la muerte apoptótica 1058
RAMÓN TRULLAS (*Barcelona*)

Role of mitochondria in neuronal death 1058
VALENTÍN CEÑA (*Albacete*)

S8. ¿Es la corteza un buen sitio para aprender? 1058
COORDINADOR: JOSÉ M. DELGADO GARCÍA (*Sevilla*)

Ponentes:

Aspectos evolutivos relativos a los circuitos básicos corticales 1058
JAVIER DE FELIPE (*Madrid*)

Control cortical de las aferencias visuales talámicas 1059
JAVIER CUDEIRO (*A Coruña*)

BDNF as a trigger for synaptic consolidation 1059
CLIVE BRAMHAM (*Bergen, Norway*)

Participación del hipocampo en el aprendizaje
asociativo de los mamíferos 1059
JOSÉ M. DELGADO GARCÍA (*Sevilla*)

S9. Neurogénesis y guía axonal 1059
COORDINADORES: JOSÉ ANTONIO DEL RÍO Y E. SORIANO (*Barcelona*)

Ponentes:

Bases moleculares de la plasticidad axonal y formación de sinapsis 1059
BEATRIZ RICO (*Alicante*)

Anosmina I y crecimiento axonal:
posibles implicaciones en neuroreparación 1060
FERNANDO DE CASTRO (*Salamanca*)

Moléculas de guía axonal y regeneración
de las conexiones corticales 1060
JOSÉ ANTONIO DEL RÍO (*Barcelona*)

CD95, una espada de doble filo en el SNC 1060
ANA MARTÍN (*Heidelberg, Germany*)

S10. Mecanismos moleculares en neurogénesis y migración 1060
COORDINADORA: ISABEL FARIÑAS (*Valencia*)

Ponentes:

Proliferación o diferenciación neural:
una decisión controlada por múltiples señales 1060
JOAN GALCERÁN (*Alicante*)

Células madre derivadas de la cresta neural 1060
RICARDO PARDAL (*Michigan, USA*)

Establecimiento del patrón dorso/ventral
en el tubo neural de vertebrados 1061
ELISA MARTÍ (*Barcelona*)

Mecanismos de migración tangencial en el telencéfalo 1061
ÓSCAR MARÍN (*Alicante*)

**S11. Las células gliales. Su origen e importancia
para la supervivencia neuronal** 1061
COORDINADORA: ÁNGELES RODRÍGUEZ-PEÑA (*Madrid*)

Ponentes:

Molecular control of oligodendrocyte precursor cell migration in the embryonic optic nerve 1061
JEAN LEON THOMAS (*Paris, France*)

Respuesta del astrocito a la lesión cerebral 1061
ANNA PLANAS (*Barcelona*)

Role of microglia in neuronal death 1062
MICHEL MALLAT (*Paris, France*)

Diferenciación de la célula de Müller 1062
CARMEN PRADA (*Madrid*)

S12. Mecanismos moleculares de la secreción 1062
COORDINADOR: JORDI MARSAL (*Barcelona*)

Ponentes:

¿Es el reciclado rápido de vesículas sinápticas equivalente al mecanismo de *kiss & run*? 1062
GUILLERMO ÁLVAREZ DE TOLEDO (*Sevilla*)

Funciones múltiples de proteínas SNARE sensibles a neurotoxina botulínica 1062
JOAN BLASI (*Barcelona*)

Role of internal matrix in synaptic vesicles 1063
CARLES SOLSONA (*Barcelona*)

Ion channels in secretory granules of the pancreas: molecular identification and their role in regulated secretion 1063
FRANK THÉVENOD (*Witten, Germany*)

S13. Bancos de tejidos neurológicos 1063
COORDINADOR: ISIDRO FERRER (*Barcelona*)

Ponentes:

Introducción. Organización y manejo de los bancos de tejidos neurológicos humanos 1063
ISIDRO FERRER (*Barcelona*)

Empleo de herramientas de genómica para la identificación de nuevas dianas terapéuticas para la depresión mayor 1063
ANTONIO MARTÍNEZ (*Baracaldo, Vizcaya*)

Empleo de plataformas genómicas en análisis genéticos de enfermedades neurodegenerativas 1064
CARLOS BUESA (*Barcelona*)

Utilización de herramientas de proteómica para la identificación de proteínas implicadas en alteraciones afectivas 1064
JOSÉ A. MORÓN (*Barcelona*)

Actividades enzimáticas en muestras de tejidos neurológicos de bancos de tejidos: fosforilación de tau en enfermedad de Alzheimer y en otras taupatías 1064
BERTA PUIG (*Barcelona*)

S14. Modelos transgénicos para estudio de la función neuronal 1065

COORDINADOR: JOSÉ RAMÓN NARANJO (*Madrid*)

Ponentes:

Modelos murinos genéticamente modificados como aproximación experimental para el estudio de la patogenia del retraso mental 1065

MARA DIERSSEN (*Barcelona*)

Caracterización fenotípica de ratones transgénicos sobreexpresando DN-DREAM en neuronas 1065
JOHN JEFFERYS (*Birmingham, UK*)

Transgenic models for diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies 1065
BELEN PINTADO, ALFONSO GUTIERREZ-ADÁN (*Madrid*)

Estudio del mecanismo patogénico en un modelo transgénico condicional de la enfermedad de Huntington 1065
JOSÉ JAVIER LUCAS (*Madrid*)

Transgenic approaches to dissecting hypocretin function 1066
L. DE LECEA (*La Jolla, CA, USA*)

Comunicaciones Orales 1067

Glía (*O 1 a O 8*) 1067
MODERADORES: A. GARCÍA Y M. NIETO SAMPEDRO

Desarrollo y plasticidad (*O 9 a O 15 y O 81*) 1069
MODERADOR: F. DE CASTRO

Enfermedad de Parkinson (*O 16 a O 23*) 1071
MODERADORES: J. SERRATOSA Y J.L. LABANDEIRA

Sistemas sensoriales: visual (*O 24 a O 31*) 1073
MODERADORES: L. MARTÍNEZ Y M.V. SÁNCHEZ

Transmisión serotoninérgica (*O 32 a O 39*) 1075
MODERADORES: A. PAZOS Y R. CORTÉS

Desarrollo y plasticidad (*O 40 a O 47*) 1077
MODERADORES: J.A. ARMENGOL Y E. VECINO

Factores neurotróficos (*O 48 a O 54*) 1079
MODERADORES: J. ALBERCH Y M. LLOVERA

Neuroanatomía (*O 55 a O 62*) 1081
MODERADORES: S. GUIRADO Y E. RODRÍGUEZ

Neurofarmacología (*O 63 a O 70*) 1083
MODERADOR: E. ALBORCH

Membranas excitables y segundos mensajeros (*O 71 a O 78*) 1085
MODERADORES: J. SATRÚSTEGUI Y M.T. PÉREZ

Desarrollo y plasticidad (*O 79 a O 85 y O 117, excepto O 81*) 1087
MODERADORES: R. SOLER Y F. GIRÁLDEZ

Mecanismos de señalización (<i>O 86 a O 92</i>) 1088	Neurotransmisores (<i>P 87 a P 130</i>) 1138
MODERADORES: J. RODRÍGUEZ Y A. PLANAS	
Sistemas sensoriales: auditivo y somestésico (<i>O 93 a O 100</i>) 1090	Dolor y analgesia (<i>P 131 a P 142</i>) 1149
MODERADORES: M. MERCHÁN Y A. NÚÑEZ	
Bases neuronales del comportamiento (<i>O 101 a O 108</i>) 1092	Desarrollo y plasticidad (<i>P 143 a P 172</i>) 1152
MODERADORES: A. TOBEÑA Y A. GRUART	
Neurotransmisores y receptores (<i>O 109 a O 116</i>) 1094	Factores neurotróficos (<i>P 173 a P 196</i>) 1160
MODERADORES: R. RIGUAL Y J. DEL RÍO	
Comunicaciones Póster 1117	Neuroanatomía (<i>P 197 a P 237</i>) 1166
Glía (<i>P 1 a P 19</i>) 1117	Neurofarmacología (<i>P 238 a P 259</i>) 1176
Desarrollo y plasticidad (<i>P 20 a P 50, P 297 y P 298</i>) 1121	Membranas excitables y segundos mensajeros (<i>P 260 a P 273</i>) 1182
Enfermedad de Parkinson (<i>P 51 a P 75</i>) 1130	Bases neuronales del comportamiento (<i>P 274 a P 282</i>) 1185
Sistemas sensoriales (<i>P 77 a P 86</i>) 1136	Otros (<i>P 283 a P 296</i>) 1188
	Índice de Autores 1192

CONFERENCIAS PLENARIAS

C 1

THE INTERACTION OF ACTIVITY AND NEUROTROPHIC FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF MOTONEURONS

Oppenheim RW

*Department of Neurobiology and Anatomy and the Neuroscience Program,
Wake Forest University Medical Center, Winston-Salem, NC*

Considerable evidence supports the basic tenets of the classic neurotrophic hypothesis regarding the regulation of motoneuron (MN) survival. Specific neurotrophic factors (NTFs) have been identified (muscle-, glial-, afferent-derived) that appear to be required for the survival of distinct sub-sets of MNs. Although the developmental regulation of MN survival by NTFs appears to be more complex than is the case, for example, for sensory or sympathetic neurons, nonetheless, a modified version of the original neurotrophic hypothesis still remains the most favored explanation of the death and survival of developing MNs. To add to the complexity of factors regulating MN survival, several lines of evidence indicate that early functional activation of MNs and muscle also play an important role in modulating MN survival. I will review recent studies of this phenomenon and discuss ways in which activity may interact with NTF availability to promote MN survival.

C 2

GFL NEUROTROPHIC FACTORS: MODE OF ACTION, BIOLOGICAL FUNCTION AND CLINICAL POTENTIAL

Johnson EM Jr

Washington University Medical School, St. Louis, MO, USA

The GFL family of neurotrophic factors (GDNF, neurturin, artemin, and persephin) consist of four TGF- β -like molecules that all exert their effects via the tyrosine kinase, RET. RET does not directly bind these factors, but rather the complete receptor complex also involves one of four GPI-anchored co-receptors (GFR α 1-4) which bind each ligand with selectivity. Examination of knockout animals demonstrates that the factors are required for proliferation and migration of neuroblasts, for axonal elongation and guidance, and for neuronal maintenance. For example, GDNF is required for the development of the enteric nervous system, and neurturin is required for the maintenance of the parasympathetic nervous system. The spectrum of these physiological effects will be discussed and compared to those of the neurotrophin family of factors. The GFLs exert survival-promoting and trophic effects on many neuronal populations of pathological interest. Most widely studied are effects on dopaminergic neurons in animal models and in clinical trials of Parkinson's disease. The pharmacological effects, and clinical potential, on these and other neuronal types will be briefly discussed.

SIMPOSIOS

S1. Corteza prefrontal y trastornos psiquiátricos

Coordinador: Francesc Artigas

1

ALTERACIONES PREFRONTALES EN ESQUIZOFRENIA

Pérez V

Departamento de Psiquiatría, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Los pacientes con esquizofrenia se caracterizan por presentar alteraciones del pensamiento, delirios y alucinaciones y un progresivo deterioro neurocognitivo y socio-familiar. La prevalencia de esta enfermedad es del 1%, el 10% se suicida. Su etiología es desconocida aunque su componente genético está bien establecido, los gemelos monozigotos presentan una concordancia del 35-58%. Los estudios de neuroimagen han permitido conocer algunas de las alteraciones relacionadas con la esquizofrenia y sus implicaciones en el tratamiento, en el que se utilizan fármacos antipsicóticos y técnicas de rehabilitación. Los estudios neuropsicológicos han confirmado importantes alteraciones prefrontales en estos pacientes con alteraciones en test como el Wisconsin o el estudio de funciones como la memoria de trabajo, el pensamiento abstracto o la atención. Estas alteraciones se han confirmado mediante neuroimagen funcional (PET o SPECT). Los estudios estructurales han evidenciado reducciones volumétricas del lóbulo frontal pero estas alteraciones estructurales aun no se han podido confirmar. Los antipsicóticos atípicos (Clozapina) son superiores a los típicos (haloperidol) en el tratamiento de los síntomas cognitivos. Se ha propuesto que la capacidad de estos fármacos para incrementar la actividad dopaminérgica prefrontal y su interacción con otros sistemas como el glutamatergico o el serotoninérgico podrían explicar este efecto terapéutico.

2

CONECTIVIDAD DE LA CORTEZA PREFRONTAL

Cavada C

Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

La corteza prefrontal (CPf) o corteza asociativa frontal presenta en primates varios sectores con funciones y conectividad diversos. El sector lateral (o CPf lateral) está implicado en funciones de anticipación, planificación y ejecución. Está conectado recíprocamente con numerosas áreas asociativas visuales, auditivas y somestésicas, con la corteza premotora y con amplios territorios de corteza límbica, en particular con áreas cingulares. El sector orbitario (o corteza orbitofrontal –COF–) es esencial para el ajuste social y emocional y para la toma de decisiones. Además de conexiones abundantes con áreas corticales visuales, auditivas, somestésicas y olfatorias, la COF conecta con amplios territorios corticales límbicos y con áreas premotoras. Es muy singular la proyección directa que recibe del sector CA1 del hipocampo. El sector medial (CPf medial), muy ligado al orbitario, participa en el control visceral relacionado con la esfera emocional. Su espectro de conexiones cortico-corticales es más limitado que el de los sectores lateral y orbitario. Todos los sectores presentan abundantes conexiones con amplios territorios talámicos que incluyen numerosos núcleos, destacando la densidad y especificidad de

las conexiones con el núcleo dorsomediano. Otras conexiones subcorticales importantes incluyen al estriado, amígdala (mayoritariamente conectada con la COF y la CPf medial), hipotálamo (abundantes conexiones con la CPf medial) y núcleos colinérgicos prosencefálicos y aminérgicos troncoencefálicos.

3

ROLE OF DOPAMINE TRANSMISSION IN PREFRONTAL FUNCTION

Thierry AM

Chaire de Neuropharmacologie, Collège de France. Paris, France

Clinical observations and experimental studies in animals indicate that the prefrontal cortex (PFC) plays a major role in cognitive processes and in the control of emotional states. Dopaminergic transmission in the PFC, which originates from the ventral tegmental area (VTA), appears to be crucial in the regulation of these functions. The influence of the mesocortical dopamine (DA) system on the transfer of information in the PFC was studied using an electrophysiological approach in anaesthetized rats. For this purpose, the mesocortical DA system was activated by electrical stimulation of the VTA. The effects of VTA stimulation on the responses evoked by activation of thalamic and hippocampal afferent inputs to the PFC were analysed. The excitatory responses induced by activation of the direct hippocampo-PFC pathway are blocked by VTA stimulation while those elicited by activation of the thalamo-cortical pathway are unaffected. Interestingly, excitatory responses resulting from the activation of the recurrent collaterals of PFC pyramidal cells that project to the thalamus are inhibited by VTA stimulation. Thus, the mesocortical DA system by suppressing the spread of excitatory activity through the recurrent collateral network, could allow a spatial focalisation of afferent excitatory signals to a restricted group of PFC cells. Furthermore, the effect of DA transmission on the transfer of information in the PFC is not homogenous but is circuit dependant.

4

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS NEURONAS DE CORTEZA PREFRONTAL POR SEROTONINA. RELEVANCIA TERAPÉUTICA

Artigas F

Departament de Neuroquímica, IIBB, CSIC (IDIBAPS)

La corteza prefrontal (CPF) juega un papel clave en funciones cerebrales superiores tales como la memoria a corto plazo, la planificación temporal o el control del comportamiento y estados de ánimo, habiéndose descrito alteraciones prefrontales en enfermos esquizofrénicos. Los fármacos antipsicóticos de nueva generación (atípicos) poseen como característica común el bloqueo de la transmisión serotoninérgica a través de los receptores 5-HT_{2A}. Dichos receptores median los efectos alucinógenos de compuestos como el LSD o el DOI y se hallan localizados preferentemente en las dendritas apicales de las neuronas piramidales de corteza. La estimulación fisiológica y farmacológica de los receptores 5-HT_{2A} aumenta actividad de las neuronas piramidales de capa V que proyectan a estructuras subcorticales, como los núcleos aminérgicos del tronco del encéfalo, regulando de este modo su actividad. Por otra parte, los receptores 5-HT_{1A}, coexisten con los 5-HT_{2A} en el 80% de las neuronas que los expresan (un 60% del total en CPF) y su activación produce efectos opuestos a la de los receptores 5-HT_{2A}. A través de estos dos receptores, la 5-HT cortical puede aumentar o reducir la actividad de las neuronas piramidales de proyección. Así, la acción terapéutica de los antipsicóticos atípicos puede deberse a una reducción de la actividad de las neuronas piramidales de la CPF tras el bloqueo 5-HT_{2A}, que reduciría las aferencias excitatorias a las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral.

S2. Papel de los sistemas cannabinoide y dopaminérgico en la adicción

Coordinador: Rafael Maldonado

1

D₃ RECEPTORS (D₃R) AND DRUG-CONDITIONED RESPONSES: PARTIAL AGONISTS OR ANTAGONISTS ?

Sokoloff P, Le Foll B, Francès H

Unité de Neurobiologie et Pharmacologie Moléculaire, INSERM U 573.

Paris, France

Environmental stimuli associated with drugs can elicit craving and relapse. Previously, we showed that a D₃R-selective partial agonist, BP 897, inhibits cocaine cue-controlled seeking behaviour, without having any intrinsic rewarding effects. BP 897 also attenuates cocaine-conditioned hyperactivity, whereas this hyperactivity is exacerbated in D₃R-knockout mice. This property has been initially attributed to the partial agonism of the compound, able to sustain D₃R stimulation and blunt excessive stimulation by drug cue-evoked dopamine. However, SB-277701A, a D₃R-selective pure antagonist, also reduces cocaine-conditioned responses. Brain functional imaging with c-fos mRNA indicate that BP 897 reduces activity in VTA, in which all dopamine neurons express D₃ autoreceptors, and increases activity in the amygdala, in which efferent neurons are inhibited by dopamine originating from VTA. Hence we suggest that attenuation of drug conditioned responses can be obtained with either an antagonist blocking postsynaptic D₃R or a partial agonist stimulating D₃ autoreceptors.

2

PAPEL DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS EN LA ADICCIÓN A CANNABINOIDES

Martín AB, Rodríguez de Fonseca R, Navarro M, Ortiz O, Sánchez-Blázquez P, Moratalla R

Instituto Cajal, CSIC, Madrid. Unidad de Investigación, Hospital Carlos Haya, Málaga. Facultad de Psicología, Universidad Complutense, Madrid

Existe evidencia de que los cannabinoides ejercen sus propiedades motoras y adictivas a través de la interacción funcional con el sistema dopaminérgico. Sin embargo, se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares y el sustrato anatómico de esta interacción. En el presente trabajo hemos demostrado la colocación del receptor CB1 con el receptor D1 en las neuronas de la vía directa y con el receptor D2 en las neuronas de la vía indirecta del estriado. Mediante estudios de condicionamiento espacial en ratones carentes del receptor D1 hemos observado que la inactivación de este receptor aumenta el condicionamiento espacial inducido por THC y también aumenta el síndrome de abstinencia al mismo inducido por SR 141716A, antagonista del receptor CB1. El efecto analgésico del THC en el test de la inmersión de la cola fue menor en los ratones D1^{-/-} que en los controles, mientras que no se observaron diferencias en cuanto a la respuesta del THC sobre la temperatura corporal entre ambos tipos de ratones. Estos resultados indican que el receptor D1 está involucrado en las respuestas adictiva y analgésica del THC, pero no interviene en el efecto sobre la temperatura corporal.

Financiado por el Ministerio del Interior, Plan Nacional sobre Drogas.

3

PAPEL DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA DEPENDENCIA DE NICOTINA

Valverde O

Laboratori de Neurofarmacologia. Departament de Ciències Experimentals i de la Salut. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona

Entre los diversos componentes del tabaco, la nicotina, tiene propiedades psicótropas e induce acciones farmacológicas diversas. En el presente estudio, hemos evaluado el papel del receptor cannabinoide CB1 en las respuestas inducidas por la administración aguda y crónica de nicotina. Hemos utilizado animales *knockout* (KO) deficientes en los receptores cannabinoide CB1. La administración aguda de nicotina produjo una disminución de la actividad locomotora y respuestas antinociceptivas en el *tail-immersion* y en el *hot-plate* en los *wild-type*. Estos efectos antinociceptivos fueron facilitados en los animales KO deficientes en el receptor CB1. Los efectos reforzantes de la nicotina se evaluaron en el modelo de preferencia de plaza. En este modelo, la administración de nicotina produjo efectos reforzantes en los animales *wild-type*, mientras que dicha respuesta se vio abolida en los animales CB1 KO. Finalmente, desarrollamos un modelo de dependencia física de nicotina. La administración de mecamilamina desencadenó la aparición de diversas manifestaciones de abstinencia en animales crónicamente tratados con nicotina. Sin embargo, no se observaron diferencias en la severidad de la abstinencia entre los animales CB1 KO y *wild-type*. Estos resultados demuestran la participación del sistema cannabinoide endógeno en diversas respuestas farmacológicas inducidas por la nicotina. Cabe destacar la implicación de los receptores CB1 en los efectos reforzantes y por tanto en sus propiedades adictivas.

4

PAPEL DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA RECAÍDA A LA ADICCIÓN A ALCOHOL

Rodríguez de Fonseca F

*Hospital Carlos Haya. Málaga***S3. Muerte celular programada durante el desarrollo del sistema nervioso***Coordinador: Enrique J. de la Rosa*

1

CONTROL OF CELL SURVIVAL DURING AXONAL GUIDANCE IN THE *DROSOPHILA* CNS

Hidalgo A, Kinrade E, McQuilton P

Molecular Cell Biology, School of Biosciences, University of Birmingham, UK

La guía axonal requiere interacciones del axon con células de glía presentes en su entorno. Las trayectorias axonales se forman en un entorno rico en células de glía que ocupan posiciones críticas y determinan cambios en dirección y fasciculación de los axones. Con dicho fin, las células de glía deben ubicarse en el lugar preciso en número preciso. Tanto la migración como el control del número celular de la glía depende de interacciones con los axones. El control del número es el resultado del ajuste entre muerte celular y proliferación. Una de las moléculas producidas por neuronas que señala en glía es Vein, el homólogo en *Drosophila* de Neuregulin. La eliminación de Vein causa apoptosis glial y defectos en guía axonal. La supervivencia neuronal se mantiene también por la glía, lo que resulta importante para la estabilidad estructural y funcional del SNC. No todas las neuronas tienen la misma dependencia de glía. Las neuronas pioneras requieren contacto con glía para trazar las primeras trayectorias axonales, pero no para sobrevivir. Esta diferencia en la

regulación de la apoptosis permite separar la formación de trayectorias axonales de procesos que ocurren más tarde. El control no autónomo de la supervivencia neuronal y glial ejerce una influencia muy importante en la guía de axones, que es independiente de otros sistemas de señalización, como el de repulsión de la línea media basado en Slit y Robo1,2 y 3. De hecho, si se compromete la supervivencia celular interfiriendo con interacciones neurona-glía, los axones cruzan la línea media y no adoptan trayectorias longitudinales y paralelas a esta, a pesar de expresar receptores del tipo Robo. Es decir, la dependencia de las células para suprimir la apoptosis determina su migración y trayectorias.

2

MOLECULAR REGULATION OF CELL DEATH DURING INNER EAR DEVELOPMENT: IGF-I ROLES

León Y, Varela-Nieto I

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM). Madrid

La apoptosis es un proceso básico que ocurre durante el desarrollo embrionario normal. Hemos analizado, durante la ontogénesis del oído interno, las redes intracelulares de señalización que inician el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I). El NGF tiene una función dual durante el desarrollo del oído interno, es un potente inductor de apoptosis en estadios tempranos mientras que en etapas posteriores es un factor trófico y de diferenciación. El NGF induce muerte celular por apoptosis mediante su unión al receptor de baja afinidad p75, incrementando los niveles intracelulares de ceramida y activando la quinasa amino terminal de Jun y la caspasa 3. El IGF-I es un factor esencial para el correcto desarrollo del oído y para el mantenimiento de la supervivencia celular, como se ha demostrado en cultivos organotípicos de otocistos de pollo y en ratones deficientes en IGF-I. El IGF-I modula la generación de mediadores lipídicos y activa vías intracelulares que conducen a la supervivencia y proliferación celular (activación de la cascada Raf/MAP quinasa, incremento de los niveles de AP-1 y PCNA). Nuestros resultados indican que, para el correcto balance entre las vías de supervivencia y muerte celular, es fundamental la relación entre NGF(p75) e IGF-1(IGFR-1), factores que controlan conjuntamente los niveles de mediadores lipídicos (ceramida/ceramida-1-fosfato), la activación de proteasas (caspasa-3) y de quinasas (Raf y Akt).

3

THE ROLE OF TGF- β IN THE REGULATION OF PROGRAMMED CELL DEATH

Kriegelstein K

Dept. Neuroanatomy, University of Göttingen. Göttingen

Programmed cell death is a fundamental and essential process in development and tissue homeostasis of multicellular organisms. About half of all neurons produced during neurogenesis die before the nervous system matures. Failure to kill appropriate cells can lead to severe developmental defects and diseases such as cancer, whereas increased cell death can lead to degenerative diseases. Transforming growth factor-beta (TGF- β) is a multifunctional cytokine. The numerous cell and tissue functions of TGF- β in nervous system development include regulation of early development, differentiation, neuronal survival as well as the induction of apoptosis. Inactivation of TGF- β in animal models via knockout approach or neutralising antibodies hints at an important function of TGF- β mediated apoptosis during tissue formation and remodeling as well as during the phase of ontogenetic neuron death. The molecular mechanisms involved in these processes seem to involve the activation of SMAD proteins and their downstream regulation of transcription. Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft.

4

ROLE AND REGULATION OF PROGRAMMED CELL DEATH DURING EARLY NEURAL DEVELOPMENT

De la Rosa EJ, Valenciano AI, Segundo C, De Pablo F

Departamento de Biología Celular y del Desarrollo. Centro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

La muerte celular programada es un proceso esencial para el correcto desarrollo del sistema nervioso. Mientras que la muerte neuronal ha sido ampliamente estudiada, la muerte que ocurre en las etapas tempranas del desarrollo neural está poco caracterizada. Durante la neurulación del embrión de pollo y la neurogénesis en la retina de pollo y de ratón se producen varios tipos de muerte, según se deduce de los diferentes mecanismos de ejecución implicados (dependientes o independientes de caspasas) y de la afectación de diferentes tipos celulares (células neuroepiteliales proliferativas y neuroblastos recién diferenciados). Su regulación depende tanto de señales intrínsecas celulares como de señales procedentes del medio ambiente celular. La expresión de la chaperona Hsc70 y la señalización por proinsulina son factores atenuadores del proceso de muerte. La evaluación precisa de la relevancia numérica de la muerte neural temprana en la retina de embrión de pollo ha evidenciado una fase temprana que comprende alrededor del 60% del total de muerte observada y afecta a células proliferativas en fase G2/M del ciclo celular. Una fase posterior, menor en términos absolutos (15%), afecta al 66% de los neuroblastos recién salidos de ciclo. En cuanto a las causas que desencadenan el proceso, estamos explorando la presencia de roturas de doble hebra en el DNA. Todos estos datos revelan un proceso de magnitud desconocida, altamente regulado y con implicaciones fisiológicas insospechadas.

S4. Mecanismos celulares y moleculares de la degeneración neuronal en la esclerosis lateral amiotrófica

Coordinador: Jordi Calderó

1

THE DEVELOPMENT OF MOTONEURONS RESCUED FROM PCD BY GENETIC DELETION OF THE PRO-APOPTOTIC GENE BAX

Oppenheim RW

Department of Neurobiology and Anatomy and the Neuroscience Program, Wake Forest University Medical Center, Winston-Salem, NC

A common assumption in the field of neuronal PCD is that the massive loss of neurons during development is a biologically adaptive phenomenon whose failure to occur would result in nervous system dysfunction. Until recently, however, valid experimental models to test this idea have not been available. The Bax KO mouse provides a reasonably good animal model to address this issue. Loss of this pro-apoptotic Bcl-2 family member rescues many (but not all) populations of central and peripheral neurons from developmental PCD. These mice appear grossly normal anatomically and behaviorally and live a normal life span. However, upon a more detailed analysis of neuroanatomical development, it appears that the neurons rescued from PCD fail to differentiate normally and are not incorporated into the functional circuitry of the nervous system. Preliminary attempts to prevent or reverse this phenotype by treatment with neurotrophic factors have been successful. We postulate that the sub-populations of excess neurons rescued from PCD by Bax deletion are unable to develop normally owing to limiting amounts of neurotrophic factors required for the growth and maintenance (vs the survival) of developing neurons.

2

POTENTIAL ROLE OF MOTONEURON-SPECIFIC CELL DEATH PATHWAYS IN NEURODEGENERATION IN ALS

Henderson CE, Raoul C, Haase G, Pettmann B

INSERM UMR382, Developmental Biology Institute of Marseille (IBDM), France.

Death pathways restricted to specific neuronal classes could potentially allow for precise control of developmental neuronal death and also underlie the selectivity of neuronal loss in neurodegenerative disease. We show that Fas-triggered death of normal embryonic motoneurons requires transcriptional upregulation of neuronal NOS and involves Daxx, ASK1, and p38 together with the classical FADD/caspase-8 cascade. No evidence for involvement of this pathway was found in cells other than motoneurons. Motoneurons from transgenic mice overexpressing ALS-linked SOD1 mutants (G37R, G85R, or G93A) displayed increased susceptibility to activation of this pathway: they were more sensitive to Fas- or NO-triggered cell death but not to trophic deprivation or excitotoxic stimulation. Thus, triggering of a motoneuron-restricted cell death pathway by neighbouring cells might contribute to motoneuron loss in ALS.

3

EXCITOTOXICITY IN THE PATHOGENESIS OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Robberecht W

Dept of Neurology and Dept of Experimental Neurology, University of Leuven, Leuven, Belgium

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal degenerative disorder, almost selectively affecting the motor neurons of the spinal cord, brainstem and the motor cortex. About 10 % of patient has an autosomal dominant form of ALS, while the remaining 90 % have no other family members affected. Rarely, the disease is inherited as an autosomal recessive or X-linked trait. Mutations in the SOD1 gene, found in about 20 % of autosomal dominant pedigrees, are the only established cause of ALS known so far. Little is known about the cause of sporadic ALS.

Evidence suggests that glutamate-induced excitotoxicity contributes to the pathogenesis of selective motor neuron death both in the familial and sporadic form of the disease. Treatment of mice overexpressing mutant SOD1, a very reliable animal for ALS, with AMPA antagonists prolongs their survival, and riluzole, the only registered drug for ALS in humans so far, is an inhibitor of glutamate release. Both direct and indirect excitotoxicity have been suggested to play a role. Increased levels of glutamate may be caused by the reduction of the glial glutamate transporter protein EAAT2, which has been found to be lost in nervous tissue of human ALS patients and of mice and rats overexpressing mutant SOD1. In vitro experiments suggest that mutant SOD1 may directly damage EAAT2. In addition, mitochondrial abnormalities induced by mutant SOD1 may render the metabolically very active motor neuron vulnerable to even normal levels of glutamate.

Motor neurons appear to be very sensitive the excitotoxic stimulation of AMPA receptors, and in particular to the Ca^{2+} -permeable subpopulation of this class of receptors. Several experimental models suggest that excitotoxic motoneuron death is directly dependent upon Ca^{2+} entering the cell through Ca^{2+} -permeable AMPA receptors, although a contribution from Ca^{2+} entering through voltage-operated Ca^{2+} channels is possible. The movement of chloride across the motoneurons' cell membrane may potentiate this Ca^{2+} -mediated neuronal death. This particular vulnerability of motor neurons to AMPA receptor stimulation is due to several factors: the high density of AMPA receptors on the motor neuron surface, the high proportion of Ca^{2+} -permeable receptors in this population, the limited Ca^{2+} -buffering capacity of motor neurons and the uptake of Ca^{2+} in mitochondria resulting in the generation of reactive oxygen species.

The high Ca^{2+} permeability of AMPA receptors on motor neurons is most probably due to the low expression of the GluR2 subunit in these cells. The importance of this GluR2 subunit in motor neuron biology is further demonstrated by the occurrence of motor neuron abnormalities in transgenic mice overexpressing an uneditable GluR2 transgene, which develop motor neuron degeneration. Rat and mouse strains may differ in their sensitivity to AMPA receptor-mediated excitotoxicity, possibly due to different levels of GluR2 expression, suggesting that differences in GluR2 expression may also exist in humans and explain the vulnerability of some individuals to conditions in which excitotoxicity is pathophysiologically involved.

4

ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO COMO UNA ALTERACIÓN TEMPRANA Y SELECTIVA EN LAS MOTONEURONAS DESPUÉS DE UN ESTÍMULO GLUTAMATÉRGICO CRÓNICO NO LETAL

Tarabal O^a, Calderó J^a, Casas C^a, Ribera J^a, Casanovas A^a, Ciutat C^a, Hernández S^a, Oppenheim RW^b, Esqueda JE^a

^aDepartament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, Lleida

^bDepartment of Neurobiology and Anatomy and Neuroscience Program, Wake Forest University School of Medicine, NC

En experimentos previos hemos demostrado que el tratamiento crónico con NMDA de embriones de pollo (E5-E9) rescata a las motoneuronas (MNs) espinales de la muerte celular programada. Después de este tratamiento, las MNs muestran una menor vulnerabilidad a las lesiones excitotóxicas agudas y una regulación a la baja de los receptores NMDA y AMPA/Kainato. Aquí, demostramos que este tratamiento provoca cambios estructurales permanentes en las MNs. Las MNs acumulan estructuras tubulovesiculares que se encuentran rodeadas por cisternas del aparato de Golgi y que son resistentes a la disrupción por brefeldina A o monensina. La inmunohistoquímica revela cambios en el contenido y/o la distribución del CGRP, del receptor KDEL y de la PDI, la cistatina C y la presenilina-1, sugiriendo una importante disfunción del tráfico de membranas y proteínas en las MNs. Las estructuras tubulovesiculares son fuertemente inmunoreactivas a un anticuerpo contra la proteína HERC1 y presumiblemente representan dominios específicos del retículo endoplasmático en los que se encuentran agregados de dicha proteína. Esto podría ser la consecuencia de un estrés que determinaría un plegamiento anómalo de las proteínas con la subsiguiente «unfolded protein response» que conduciría a la degeneración de las MNs y a su muerte diferida. Estos resultados demuestran que el tratamiento crónico con NMDA induce cambios importantes en el sistema de endomembranas y sugieren alteraciones en el plegamiento, procesamiento y tráfico de proteínas que pueden estar relacionados con algunas alteraciones neuropatológicas descritas en la enfermedad de la MN.

S5. Calcio y función neuronal

Coordinador: J. García-Sancho

1

INTRA-ER CALCIUM DYNAMICS AND NEURONAL SIGNALLING

Verkhratsky A

The University of Manchester, School of Biological Sciences, Manchester, UK.

The endoplasmic reticulum (ER) is an intracellular organelle of fundamental importance present in all types of eucariotic cells. The ER is found in all neurones, where it forms a continuous network occupying

cell somata, and extending towards axons, dendrites and dendritic spines. The ER lumen is densely packed with numerous enzymatic systems that allow protein synthesis in the rough endoplasmic reticulum and correct post-translational «folding» of these proteins. Any malfunctions in the latter process result in accumulation of unfolded proteins, which in turn activates several signalling systems aimed at appropriate compensatory responses. At the same time, the ER is intimately involved in neuronal Ca^{2+} signalling via Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) or inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release (IICR), controlled by two subsets of Ca^{2+} release channels residing in the ER membrane, the ryanodine receptors (RyRs) and the InsP3-receptors (InsP3Rs). The ER Ca^{2+} store emerges as a single interconnected Ca^{2+} pool, although the RyRs and InsP3Rs show heterogeneous localisation in distinct cellular sub-compartments, conferring thus specificity in local Ca^{2+} signals. The continuity of the ER Ca^{2+} store could play an important role in various aspects of neuronal signalling. For example, Ca^{2+} ions may diffuse within the ER lumen with comparative ease, endowing this organelle with the capacity for « Ca^{2+} tunnelling». Intra-ER [Ca^{2+}] fluctuations also appear to be a key factor determining the activity of synthesis and processing of proteins within the ER. The disruption of intra-ER Ca^{2+} homeostasis can be involved in neurodegenerative disorders such as diabetic peripheral neuropathies and Alzheimer disease.

2

REGULACIÓN GÉNICA POR CALCIO: ASPECTOS FUNCIONALES DEL REPRESOR DREAM

Naranjo JR

Dpto. de Biología Molecular y Celular. Centro Nacional de Biotecnología. CSIC. Madrid

3

CALCIO Y TRANSDUCCIÓN SENSORIAL

Viana F

Instituto de Neurociencias. Universidad Miguel Hernández-CSIC. Alicante

El ión calcio juega un papel fundamental en distintos aspectos de la transducción sensorial, como son la amplificación y la adaptación de señales. Además de actuar como transportador de carga y mensajero intracelular, las señales de Ca^{2+} tienen otros aspectos de interés práctico en el estudio de neuronas sensoriales. En cultivos ganglionares hemos utilizado el Ca^{2+} intracelular como un eficaz reportero de actividad neuronal. Mediante imagen es posible detectar neuronas que se activan de forma específica tras la aplicación de un estímulo (temperatura, mecánico o químico). Esto permite identificar subpoblaciones escasamente representadas, como es el caso de neuronas sensibles a estímulos de frío, que posteriormente pueden ser analizadas con técnicas electrofisiológicas, inmunocitoquímicas y moleculares. En neuronas termosensibles estos aumentos del Ca^{2+} se deben a la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y en menor grado al flujo a través de un canal catiónico inespecífico (TRPM8), activado por frío y mentol. La desensibilización de TRPM8 es mucho mayor durante la activación con mentol, y ambas están influenciadas por el Ca^{2+} extracelular.

También hemos utilizado el Ca^{2+} como marcador positivo en el cribado funcional de una genoteca del ganglio raquídeo. Ello nos ha permitido identificar una proteína, GAP43, cuya sobreexpresión potencia la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares sensibles a IP3 durante la aplicación de estímulos osmótico/mecánicos.

4

CALCIO Y NEUROPROTECCIÓN FARMACOLÓGICA

Villarroya M, De los Ríos C, León R, Orozco C, Merchán P, Arias E
Instituto Teófilo Hernando. Dpto. de Farmacología y Terapéutica (UAM)

La sobrecarga de Ca^{2+} tanto por entrada desde el exterior de la célula como por liberación de depósitos intracelulares se ha probado repetidamente que es un estímulo apoptótico. También la mitocondria está implicada en procesos de muerte neuronal: tras la entrada masiva de Ca^{2+} a través del receptor de NMDA, se produce despolarización de la membrana mitocondrial, lo que provoca la apertura de un poro de permeabilidad transitorio (PPTM), con el consiguiente colapso del potencial y el desencadenamiento del proceso apoptótico.

El conocer bien los posibles mecanismos de inducción de muerte celular por sobrecarga de Ca^{2+} nos permitirá interferir con ellos de una u otra manera para prevenirla. Concretamente, en el caso de la enfermedad de Alzheimer donde únicamente los inhibidores de la acetilcolinesterasa han dado algún resultado positivo mejorando la cognición, el interés de muchos grupos de investigación se centra hoy en la búsqueda de fármacos con un doble mecanismo de acción.

Encontrar un compuesto que conservase algún efecto anticolinesterásico y además fuese bloqueante de canales de Ca^{2+} , o potenciador moderado de algún subtipo de canal podría significar encontrar un fármaco neuroprotector que fuese útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de otras enfermedades neurodegenerativas.

5

PARTICIPACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS EN LA SEÑAL DE CALCIO

García-Sancho J

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Universidad de Valladolid y CSIC, Facultad de Medicina. Valladolid

Las organelas intracelulares pueden modificar las señales de Ca^{2+} y la exocitosis. Por otro lado, la $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro de las organelas regula por sí misma funciones fisiológicas importantes. Combinando la expresión de eucorinas dirigidas inducida por un vector viral y técnicas de imagen por conteo de fotones puede resolverse la dinámica de las señales citosólicas y mitocondrial a nivel de célula única en células cromafines y adenohipofisarias, usadas aquí como modelo de células excitables.

Al activar de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (VOOC), las mitocondrias captan enormes cantidades de Ca^{2+} través del uniportador mitocondrial. El análisis de los resultados indica que se generan dominios citosólicos subplasmalemales con muy alta $[\text{Ca}^{2+}]$, adecuada para la exocitosis. En el centro de la célula se produce un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ mucho menor, adecuado para el reclutamiento del pool de reserva de vesículas secretorias. El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ mitocondrial estimula la respiración en las mitocondrias subplasmalemales, que proporcionan así apoyo local al proceso exocitótico.

Las células adenohipofisarias presentan actividad eléctrica espontánea, que genera las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico, responsables de la secreción de las hormonas hipofisarias. Los factores hipotalámicos modulan esta actividad y así controlan la secreción. Con las eucorinas dirigidas hemos medido oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en citosol, mitocondrias y núcleo. Una fracción de las mitocondrias, probablemente próximas a los VOCC, amplifican las oscilaciones citosólicas. Estas oscilaciones son de suficiente amplitud para estimular la respiración, proporcionando la base para el ajuste local de la función mitocondrial.

S6. Terapias celular y génica en las enfermedades neurodegenerativas

Coordinador: José López Barneo

1

FACTORES NEUOTRÓFICOS Y TERAPIAS CELULARES EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Toledo-Aral JJ

Laboratorio de Investigaciones Biomédicas y Dpto. de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla y Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la muerte progresiva de neuronas que pueden afectar de forma generalizada o de manera específica a estructuras concretas del sistema nervioso. En este último caso es más fácil diseñar ensayos de terapia celular, tanto sustitutoria de neurotransmisores como productora de factores neurotróficos con efecto regenerador y/o protector. Recientemente se ha estudiado en el laboratorio la eficacia y mecanismo de acción de los trasplantes de agregados celulares de cuerpo carotídeo (CC) en modelos de enfermedad de Parkinson (EP), patología que resulta fundamentalmente de la destrucción de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas que proyectan al estriado. Las células del CC son especialmente adecuadas para el trasplante en casos de EP debido tanto a su alto contenido en dopamina como a su elevada supervivencia en hipoxia. Además, la resección unilateral del CC no tiene efectos secundarios señalables, lo que hace factible el autotrasplante en pacientes parkinsonianos. El estudio realizado muestra que el tejido carotídeo trasplantado intraestriatalmente induce una mejoría de los aspectos conductuales, histológicos y funcionales de los animales parkinsonianos que se correlaciona con el mantenimiento de células de CC metabólicamente activas por casi la totalidad de la vida de los animales. Los efectos beneficiosos de los trasplantes de agregados celulares de CC se deben a un efecto trófico sobre la vía nigroestriatal más que a la liberación de dopamina por el implante. En relación con esta acción se ha demostrado que las células glómicas del CC adulto expresan cantidades altas del potente factor dopaminotrófico GDNF y que esta característica se mantiene en el tejido trasplantado. Este trabajo indica que los agregados celulares de cuerpo carotídeo son bombas duraderas y estables de factores neurotróficos, lo que permite plantear su uso en terapia celular en la EP y otras enfermedades neurodegenerativas.

2

DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE NEURALES

Vicario-Abejón C^a, Yusta-Boyo MJ^a, Pavón N^b, Vergaño-Vera E^a, González MA^c, Martín AB^b, Bernad A^d, Moratalla R^b, De Pablo F^a

^a Grupo de Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). ^b Instituto Cajal, CSIC. ^c Genetrix SL, Centro Nacional de Biotecnología (CNB), CSIC. ^d Departamento de Inmunología y Oncología, CNB, CSIC. Madrid.

Recientemente, hemos aislado células del bulbo olfatorio (BO) de embriones de ratón (E14,5) que poseen características de CMN, es decir, autorrenovación y potencialidad de generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Vicario-Abejón et al. J Neurosci 2003; 23: 895-906). Para conocer si las CMN de BO se diferencian en diversos tipos de neuronas maduras, se crecieron células durante 2-3 semanas en presencia de factores neurotróficos como BDNF, NT-3 e IGF-1. En estas condiciones, se obtuvo un alta proporción (40-50%) de neuronas gabérgicas, de las cuales aproximadamente un 20% fueron dopaminérgicas. Dichas células expresaron proteínas sinápticas como la sinapsina-I. En el BO de ratones mutantes (*knockouts*) para Igf-1 se observó una disminución en el grado de maduración de las neuronas dopaminérgicas. Con objeto de estudiar su diferenciación in vivo, se prepararon CMN a partir de BO de ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) y se trasplantaron en el cerebro de ratones adultos. Ocho meses después del

trasplante, se encontraron células con morfologías y marcadores antigénicos característicos de neuronas y glía. Los resultados indican que las CMN de BO tienen el potencial de diferenciarse en neuronas maduras. Se está investigando si dichas células y neuronas dopaminérgicas derivadas de las mismas, en combinación con factores neurotróficos, corrigen los déficits motores de animales parkinsonianos.

3

INDUCCIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS A PARTIR DE PRECURSORES NEURONALES Y DE CÉLULAS MADRE

Arenas E

Laboratory of Molecular Neurobiology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute. Stockholm, Sweden

Las células madre son células capaces de autorrenovarse y de diferenciarse en múltiples linajes celulares. Estas células, que pueden ser aisladas a partir de la masa celular interna de un embrión, de tejidos fetales o de tejidos adultos, se han propuesto como posibles candidatas para reemplazar neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson. Por ahora la terapia celular sustitutiva en la enfermedad de Parkinson se ha basado en el uso de tejido fetal humano, que es difícil de estandarizar y de obtener en cantidades suficientes para ejercer un efecto terapéutico (6 embriones por paciente). Las células madre por su capacidad de autorenovación podrían permitir una expansión ilimitada y por su capacidad para generar tejido neural podrían constituir una herramienta eficaz en la terapia celular sustitutiva. Nuestros esfuerzos para desarrollar este tipo de terapia se centran en la caracterización de las propiedades básicas de las células madre, en el estudio de los mecanismos que gobiernan el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas y en la implementación de estos mecanismos en células madre. En nuestros estudios hemos expresado el receptor nuclear Nurr1, que es necesario para el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Este receptor, que carece de ligando conocido, concede a en diversos tipos de células madre y precursores neuronales la capacidad de diferenciarse en neuronas dopaminérgicas en respuesta a señales solubles derivadas de células gliales embionarias del mesencéfalo ventral. En la actualidad estamos investigando diversos factores que se expresan en el mesencéfalo ventral durante el desarrollo y que son candidatos a participar en la inducción de un fenotipo dopaminérgico. Por otra parte estamos analizando mediante técnicas de genómica los genes que son regulados por Nurr1 en una célula madre neural, y mediante técnicas de proteómica las proteínas que se expresan en células gliales del mesencéfalo ventral, que son capaces de inducir un fenotipo dopaminérgico en células Nurr1+. Nuestros resultados indican que se puede instruir un fenotipo dopaminérgico en células madre recreando una combinación de factores genéticos y ambientales como los que se dan durante el desarrollo del mesencéfalo ventral. Esperamos que la identificación de estas señales permitirá desarrollar: (1) nuevos protocolos para inducir un fenotipo dopaminérgico más completo en células madre, (2) una terapia celular sustitutiva más eficaz.

4

TRANSFERENCIA IN VIVO A NEURONAS DE PURKINJE USANDO AMPLICONES DE HERPES SIMPLE I

Wandosell F^a, Agudo M, Trejo JL^b, Lim F^a, Ávila J^a, Torres-Alemán I^b, Díaz-Nido J^a

^aCentro de Biología Molecular SO, CSIC-UAM. Cantoblanco, Madrid.

^bInstituto Cajal, CSIC. Madrid.

Vectores derivados de herpes simple se configuran como unos candidatos muy buenos para validar dianas concretas, así como para terapia génica en sistema nervioso, por su alta especificidad neuronal. Hemos usado una serie de amplicones de HSV1, conteniendo LacZ para transducir *in vivo* de neuronas de cerebelo. Hemos inyectado estereotáxicamente estos

amplicones en corteza de cerebelo, ventrículo y oliva inferior. En el primer caso hemos podido detectar una baja eficiencia de traducción, y localizada a algunas zonas adyacentes. En el segundo caso hemos observado una transducción preferente de las células del epéndimo, lo que podría tener un uso concreto a la hora de poder generar y liberar factores tróficos, por ejemplo.

Es más remarcable el tercer caso en el que hemos comprobado una gran alta capacidad de transducción, atendiendo a la alta presencia de neuronas de Purkinje que son beta-galactosidasa positivas (1 de cada 3-4). La expresión del trasgén se mantiene durante unos 40 días. Un dato muy importante fue la falta de signos apreciables de toxicidad celular, tal como astrositos reactivos o microglia activada.

Estos datos abren la posibilidad del uso de estos vectores en modelos de lesión de patologías de cerebelo y como sistema para validar dianas neuronales.

S7. Mecanismos moleculares en la muerte neuronal apoptótica

Coordinador: Valentín Ceña

1

CELL CYCLE AND NEURONAL DEATH

Nicoletti F

University of Catania. Catania, Italy

2

MECANISMOS IMPLICADOS EN LA MUERTE NEURONAL APOPTÓTICA POR CERAMIDA

Rodríguez-Álvarez J

Instituto de Neurociencias y Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona

La ceramida es un mensajero intracelular de carácter lipídico que ha sido implicado en los mecanismos de muerte celular apoptótica en diferentes tejidos, incluyendo el sistema nervioso. Este lípido puede ser generado a través de dos vías: 1) a partir de la condensación de serina y palmitoil-CoA y posterior conversión del producto en ceramida por acción del enzima ceramida sintasa y/o 2) por hidrólisis de la esfingomielina mediante la acción de diversas enzimas denominadas esfingomielinasas. Utilizando un modelo de isquemia cerebral *in vitro*, en el que cultivos corticales eran privados de oxígeno y glucosa (OGD), hemos podido constatar que un 50% de las células mueren por apoptosis dependiente de la producción de TNF- α . En este contexto, la OGD aumenta la concentración intracelular de ceramida por activación de la ceramida sintasa. La inhibición de la ceramida sintasa no solamente reduce significativamente el número de neuronas con cromatina condensada o fragmentada, sino que también inhibe la activación de la caspasa-3. Por otro lado, la adición de análogos de ceramida a cultivos neuronales a permitido observar que la activación de la caspasa-3 esta precedida por una activación de la caspasa-9, mientras que no se ha detectado ningún cambio en la actividad caspasa-1, -2 y -8. Estos datos permitirían indicar que, en los sistemas estudiados, la síntesis de ceramida sería un evento anterior a la activación de las caspasas y que podría desencadenarse tanto por una vía intrínseca (mitocondria) como extrínseca (receptores de membrana con dominios *death*).

3

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PENTRAXINA NEURONAL DURANTE EL PROCESO DE LA MUERTE APOPTÓTICA

De Gregorio-Rocasolano N, Enguita M, Gasull T, Trullas R
Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC, IDIBAPS

En neuronas adultas, la muerte puede producirse por mecanismos ya existentes en la célula o necesitar de la expresión *de novo* de genes de muerte. Se ha propuesto que los mecanismos responsables de la muerte neuronal inducida por privación de potasio en células granulares de cerebelo son similares a los que operan en la apoptosis neuronal que sucede durante el desarrollo. Estos mecanismos se caracterizan por depender de la síntesis *de novo* de RNA y proteínas. En nuestro laboratorio hemos investigado la expresión génica durante la fase inicial del programa de muerte neuronal. Los resultados obtenidos hasta el momento han demostrado que una glicoproteína secretora de masa molecular aparente de aproximadamente 50 kDa, la pentraxina neuronal 1 (NP1), forma parte del programa de expresión génica que se activa por diversos estímulos que desencadenan el proceso de muerte neuronal. La expresión de np1 se restringe al sistema nervioso. El tratamiento con privación de potasio induce un incremento en los niveles de mRNA de np1 hasta 15 veces mayor que el de las células control mantenidas en condiciones despolarizantes. El incremento del mRNA de np1 se acompaña de un incremento en los niveles de proteína NP1 de entre 3 a 6 veces por encima de los niveles control. La sobreexpresión de np1 alcanza su máximo después de 4 h de exposición a la privación de potasio. El aumento de los niveles de NP1 precede a la muerte neuronal como mínimo en unas 4 h y el máximo de expresión corresponde al tiempo en el que las células granulares de cerebelo entran de forma irreversible en el proceso de muerte apoptótica. Por su homología, la NP1 forma parte de la familia de las Pentraxinas que se divide en dos clases estructurales de proteínas en base a su tamaño. Las proteínas de la subfamilia de las pentraxinas largas, como la NP1 y la pentraxina relacionada con actividad neuronal (Narp), a pesar de compartir una homología muy elevada en la mitad del extremo carboxilo terminal, tienen aproximadamente el doble de tamaño que las pentraxinas clásicas cortas, lo cual indica que tienen funciones adicionales. En base a la homología que NP1 tiene con las pentraxinas más cortas, como la proteína C-reactiva y la proteína P amiloide de suero, se ha propuesto que la función de la NP1 es la de captar material durante la remodelación sináptica. Por otro lado, resultados recientes han demostrado que Narp agrupa receptores AMPA en sinapsis excitadoras e induce crecimiento neurítico. Al contrario que NP1, NARP se induce de forma muy rápida por actividad sináptica o condiciones despolarizantes. Asimismo, resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que a diferencia del marcado incremento que el tratamiento con privación de potasio produce sobre la expresión de NP1, tal tratamiento no produce cambios en la expresión de Narp. En base a estos resultados hemos planteado la hipótesis de que Narp y NP1 funcionan como un interruptor génico que permite detectar cambios en actividad sináptica. Subvencionado por MCyT, BF12001-1035, y FIS PI020555, G03/067.

4

ROLE OF MITOCHONDRIA IN NEURONAL DEATH

Jordán J, Galindo MF, Tormero D, González-García C, Ceña V
*Centro Regional de Investigaciones Biomédicas.
 Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete*

Apoptosis is an active process that is regulated by different signaling pathways. One of the more important organelles involved in apoptosis regulation is mitochondrion. Disruption of electron chain transport produces free radical production leading to multiple conductance channel opening, release of cytochrome c and caspase activation. We have used isolated brain mitochondria to investigate the effects of Ca^{2+}

and superoxide (O_2^-) on mitochondrial parameters such as swelling, potential, enzymatic activity, NAD(P)H, cytochrome c and caspase activity release. Additions of Ca^{2+} or the reactive oxygen species (ROS) generator KO_2 produced brain mitochondrial swelling, that was blocked by cyclosporin A. ROS-induced swelling was Ca^{2+} -independent, although ROS participated significantly in Ca^{2+} -induced swelling. Under our experimental conditions, Ca^{2+} but not O_2^- , triggered a rapid loss of mitochondrial potential. Ca^{2+} -induced $\Delta\psi_m$ dissipation was inhibited by ruthenium red, but not by cyclosporin A. Calcium and O_2^- -induced swelling released cytochrome c and caspase activity from isolated mitochondria in a CsA-sensitive manner.

6-Hydroxydopamine (6-OHDA) has been widely used to generate Parkinson disease like models. It is able to generate free radical and to induce catecholaminergic cell death. Bcl-x_L-antiapoptotic signal pathway seems to be mediated by preventing mitochondrial multiple conductance channel opening, cytochrome c release and caspase-3 like activity following 6-OHDA treatment in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Our results provide evidence that 6-hydroxydopamine induced, after auto-oxidation, toxic levels of H_2O_2 , that caused cell toxicity and death. 6-Hydroxydopamine treatment markedly reduced, in a dose-response fashion, cell viability. Cell death was accompanied by cell shrinkage, nuclear condensation and DNA degradation. Under our experimental conditions, 6-hydroxydopamine auto-oxidation formed quinones and reactive oxygen species that mainly contributed to 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity. Accordingly, different antioxidants, including catalase, vitamin E, MnTBAP or ascorbic acid, provided protection against 6-hydroxydopamine-induced toxicity.

This work has been supported, in part, by grants SAF99-0060 from CICYT, BF12001-1565 from Ministerio de Ciencia y Tecnología; G03/167 from Ministerio de Sanidad, GC02-029 and PAI-02-031 and GC-02-019 from Consejería de Ciencia y Tecnología, JCCM and from Fundación Campollano-Banco Santander Central Hispano to V.C., BF12001-1058 from Ministerio de Ciencia y Tecnología and from Consejería de Sanidad JCCM to C.G.G. and SAF2002-04721 from CICYT to J.J. M.F.G. and D.T. are fellows from JCCM.

S8. ¿Es la corteza un buen sitio para aprender?

Coordinador: José M. Delgado García

1

ASPECTOS EVOLUTIVOS RELATIVOS A LOS CIRCUITOS BÁSICOS CORTICALES

De Felipe J

Instituto Cajal (CSIC). Madrid

La neocorteza es la estructura de elección de muchos teóricos y experimentalistas por su implicación directa en diversos aspectos del comportamiento de los mamíferos, porque es la estructura donde se localizan aquellas capacidades que distinguen a los humanos de otros mamíferos (por ejemplo, el lenguaje y la capacidad de abstracción) y porque cuando se altera produce graves alteraciones neurológicas o psiquiátricas. En general, la neocorteza contiene un conjunto similar de elementos como en cualquier otra región del sistema nervioso central: dos tipos principales de neuronas (neuronas de proyección e interneuronas), tres tipos de células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglia), dos tipos de fibras nerviosas (extrínsecas e intrínsecas) y vasos sanguíneos. Por otra parte, las propiedades fisiológicas, los neurotransmisores, receptores y otros compuestos que normalmente se encuentran en neuronas corticales no son característicos de la neocorteza, sino que se encuentran en diversas regiones del cerebro. De este modo, el principal reto de la Neurociencia es conocer cuál es el sustrato neuronal que hace a un ser humano ser humano. En otras palabras, qué tiene de especial la neocorteza humana y cómo se diferencia de la de otras especies. Aunque parezca sorprendente, a

pesar del gran número de estudios realizados desde los estudios de Cajal, todavía no sabemos cuáles son las características funcionales y microanatómicas fundamentales que distinguen al cerebro humano del cerebro del resto de los mamíferos. Esto se debe en parte a que la opinión generalmente aceptada de que las diferencias entre la corteza cerebral del hombre y de otros mamíferos es solamente cuantitativa, es probablemente errónea.

2

CONTROL CORTICAL DE LAS AFERENCIAS VISUALES TALÁMICAS

Cudeiro J, Rivadulla C, Mariño J, Martínez L, de Labra C
NEUROcom (Neurociencia y Control Motor), Dpto. Medicina, Universidad de A Coruña

Los sistemas sensoriales están constituidos por multitud de estructuras profusamente interconectadas, que, de forma jerárquica, permiten la comunicación entre neuronas alejadas del receptor. Cada estructura se caracteriza por unas determinadas propiedades de sus campos receptores que reflejan la creciente elaboración de la señal sensorial a medida que avanza en el sistema nervioso, es decir un procesamiento hacia delante o *feedforward*. Esas propiedades también están poderosamente influidas por las interacciones laterales entre distintas áreas/estructuras y por las conexiones hacia atrás o *feedback*. Recientemente se ha comenzado a desvelar la importancia crítica de dichas conexiones y la manera cómo los sistemas *feedback* contribuyen al procesamiento sensorial, el aprendizaje y los procesos cognitivos en general. En esta presentación exploraremos la importancia de las conexiones *feedback*, tomando como modelo el sistema visual, y en concreto el circuito tálamo-córtico-talámico. Nos centraremos en los efectos moduladores de la corteza sobre el tálamo mediados por los receptores metabotrópicos de glutamato, y en el papel activador que sobre la actividad cortical ejerce el óxido nítrico. Financiando por CICYT-PB1998-0179 y MCYT-BFI2002-03200. C. de Labra es becaria posdoctoral del MEC.

3

BDNF AS A TRIGGER FOR SYNAPTIC CONSOLIDATION

Bramham CR
Department of Physiology and Locus on Neuroscience, University of Bergen, Norway

Neurotrophic factors are important regulators of neuronal development and survival, yet the functions of neurotrophins in the adult brain are still little understood. We checked the effects of acute, local infusion of BDNF on synaptic efficacy at medial perforant path-granule cell synapses in the dentate gyrus of adult anesthetized rats. BDNF infusion led to a LTP of synaptic transmission. BDNF-LTP required ERK activation and was coupled to ERK-dependent phosphorylation of CREB. BDNF-LTP was also associated with ERK-dependent upregulation of Arc, an early gene critically involved in protein synthesis-dependent, late phase LTP and long-term memory. Arc mRNA was induced in postsynaptic granule cells bodies and rapidly delivered to granule cell dendrites. Local pharmacological inhibition of ERK activation or transcription blocked BDNF-LTP and the associated upregulation of Arc protein. Application of inhibitors after BDNF infusion was without effect, defining a time window for the induction of BDNF-LTP. The functional role of BDNF-LTP was assessed in occlusion experiments with classical high-frequency stimulation-induced LTP. BDNF-LTP was occluded during late phase, but not early phase, HFS-LTP. BDNF was further shown to regulate translation control pathways while rapidly enhancing the synaptic expression of CaMKII protein. The results support a role for BDNF as a consolidation factor in long-term synaptic plasticity in the adult brain. BDNF appears to act dually through regulation of transcription and translation.

4

PARTICIPACIÓN DEL HIPOCAMPO EN EL APRENDIZAJE ASOCIATIVO DE LOS MAMÍFEROS

Delgado-García JM
División de Neurociencias, L.A.B., Universidad Pablo de Olavide. Sevilla

El hipocampo es una estructura cerebral a la que se ha prestado gran atención experimental. Su hermosa citoarquitectura descrita por Lorente de Nó (1934) ha atraído desde siempre el interés de numerosos investigadores. Por otra parte, estudios *in vitro* de rodajas de hipocampo han permitido poner de manifiesto determinados mecanismos celulares y moleculares que, al parecer, subyacen a los procesos de memoria y aprendizaje a largo plazo (Bliss y Collingridge, 1993). Desde el punto de vista clínico, el hipocampo se relaciona con procesos que afectan la capacidad de aprender y/o recordar. La degeneración del hipocampo, junto con la disrupción de sus conexiones aferentes y/o eferentes constituye un factor clave en la génesis de los déficit mnésicos característicos de las demencias, particularmente en la enfermedad de Alzheimer. El presente trabajo representa un esfuerzo inicial para el diseño de un modelo experimental que permita el estudio de las demencias y su posible abordaje farmacológico. El modelo permite el registro *in vivo* de la actividad eléctrica de neuronas piramidales de la corteza hipocámpica, las cuales representan la salida del sistema, así como el registro del EMG del músculo *orbicularis oculi* y de la posición del párpado, mediante la técnica del seguidor magnético. Como prueba de aprendizaje se utiliza el condicionamiento clásico del reflejo corneal (con paradigmas de traza y de demora). Realizado con ayudas de La Caixa, JA / CVI-122 y DGICYT (BFI2002-00936).

S9. Neurogénesis y guía axonal

Coordinadores: J.A. del Río y E. Soriano

1

BASES MOLECULARES DE LA PLASTICIDAD AXONAL Y FORMACIÓN DE SINAPSIS

Rico B
Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC. Alicante

Durante el desarrollo las neuronas establecen conexiones mediante la extensión y arborización de sus axones, los cuales formarán finalmente sinapsis con sus células diana. Las características funcionales y el patrón de expresión de proteínas tirosina kinasas como el receptor de neurotrofinas TrkB y la proteína citoplasmática FAK, convierten a estas moléculas en candidatas atractivas para la traducción de señales desde el espacio extracelular al intracelular, crucial en el desarrollo de las conexiones axonales.

Con el objeto de estudiar el papel de TrkB y FAK *in vivo* e *in vitro* hemos generado ratones mutantes condicionales de cerebelo y/o específicos celulares. Nuestros resultados demuestran que mientras que la señalización mediada por TrkB es una señal positiva para el desarrollo del árbol axonal, terminales axónicas y sinapsis, la activación de FAK resulta en una regulación negativa de estos procesos. Puesto que ambas kinasas tienen un papel prominente en los cambios plásticos en desarrollo, parece razonable pensar que también podrían jugar un papel similar en plasticidad en el cerebro adulto.

2

**ANOSMINA I Y CRECIMIENTO AXONAL:
POSIBLES IMPLICACIONES EN NEURORREPARACIÓN**

De Castro F

Instituto de Neurociencias de Castilla y León . Universidad de Salamanca

La proteína anosmina-1 falta en la forma ligada al cromosoma X del síndrome de Kallmann, una enfermedad en la que se asocian un defecto en el desarrollo sexual y la falta total o parcial de sentido del olfato (anosmia). La primera función fisiológica que se ha revelado para el caso de la anosmina-1 está relacionada con el proceso de crecimiento de los axones de las neuronas de proyección del bulbo olfativo (células mitrales y empenachadas) durante el desarrollo: la anosmina-1 se comporta como un factor quimioatractivo para estos axones, remediando el efecto que se observa con explantes de córtex piriforme, estructura diana de las citadas neuronas y que expresa anosmina-1. De igual forma, la adición *in vitro* de anticuerpos bloqueantes anti-anosmina-1 previene la formación de colaterales axónicas (la forma que tienen las citadas neuronas de colonizar su diana fisiológica, el córtex olfativo) sin afectar a los axones primarios (córtex olfativo lateral). Se trata de uno de los primeros factores involucrados de forma específica en la formación de colaterales a partir de axones primarios. La proteína anosmina-1 parece, por tanto, esencial para la correcta formación de las proyecciones centrales del bulbo olfativo.

3

**MOLÉCULAS DE GUÍA AXONAL Y REGENERACIÓN
DE LAS CONEXIONES CORTICALES**

Del Río JA

Desarrollo y regeneración del SNC. Universidad de Barcelona

El desarrollo de las conexiones neuronales es un proceso complejo en el que participan de forma coordinada numerosas moléculas de guía axonal. Una vez concluido el desarrollo, muchos de estos factores dejan de expresarse en el SNC de forma que, en su ausencia, las neuronas axotomizadas no pueden recapitular su programa de desarrollo y no pueden recrear sus axones. Además, algunos factores inhibidores se sobreexpresan en las zonas lesionadas potenciando aún más la ausencia de regeneración axonal. Por ello, un enfoque neuroreparador ha de ser forzosamente multifactorial. Nuestro grupo en los últimos años ha analizado algunos de los factores que intervienen en el desarrollo y la regeneración de la conexión entorrino-hipocámpica de roedores. Hemos podido comprobar que los factores moleculares que participan activamente durante el desarrollo de estas conexiones están implicados en la ausencia de regeneración axonal en el adulto. Entre estos factores nos encontramos: i) los factores derivados de las células de Cajal-Retzius, y ii) factores inhibidores como las semaforinas secretables o antígenos asociados a la mielina como Nogo-A.

4

CD95, UNA ESPADA DE DOBLE FILO EN EL SNC

Martín A

Centro Alemán de Investigación contra el cáncer (DKFZ)

El CD95 (Apo-1/Fas), un receptor perteneciente a la familia de factores de necrosis tumoral, TNF, y a la subfamilia de los receptores de muerte, es mayormente conocido como inductor de muerte celular por apoptosis. La unión del CD95 a su ligando (CD95L) lleva a la activación de caspasas quienes finalmente fragmentan factores esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular. En el sistema nervioso adulto, la expresión de CD95 y del CD95L aumenta en situaciones patológicas como el ictus o el trauma medular. En

ratones deficientes en un CD95L funcional (gld) o un CD95 funcional (lpr) la oclusión de la arteria cerebral media dio lugar a infartos cerebrales de volumen considerablemente menor que en ratones de tipo salvaje. También, el tratamiento con anticuerpos neutralizantes del CD95L tras un trauma medular facilitó el inicio de movimientos activos de los miembros inferiores varias semanas después del trauma inicial, mientras que los animales no tratados permanecieron paraplégicos. Dicha recuperación funcional se vio reflejada en un mantenimiento de la mielinización de los tractos dañados y de los marcadores neuronales, tubulina-III-β y Tau.

En el cerebro en desarrollo la expresión de CD95 y CD95L se encuentra en áreas con niveles detectables de apoptosis. Sin embargo, en ratones con la mutación lpr o gld no se detectaron diferencias en la densidad celular en dichas áreas en comparación con ratones de tipo salvaje. En neuronas hipocámpicas embrionarias la adición de CD95L indujo un aumento de la ramificación axonal. En resumen, la activación de CD95 puede inducir apoptosis, como es el caso del cerebro adulto en situaciones patológicas, o remodelación neuronal como en el cerebro embrionario.

**S10. Mecanismos moleculares
en neurogénesis y migración***Coordinadora: Isabel Fariñas*

1

**PROLIFERACIÓN O DIFERENCIACIÓN NEURAL:
UNA DECISIÓN CONTROLADA POR MÚLTIPLES
SEÑALES**

Galcerán J

Instituto de Neurociencias CSIC-UMH. Sant Joan d'Alacant

La estructura del sistema nervioso adulto es el resultado de la integración de procesos de proliferación y diferenciación sobre el neuroectodermo embrionario. La regulación temporal y espacial de ambos procesos controla la estructura y funcionalidad del sistema nervioso. Como resultado, el animal que lo alberga puede desarrollar una vida autónoma.

Los procesos de proliferación y diferenciación están gobernados en parte por información intrínseca celular, pero en gran medida por la integración de las vías de señalización que actúan durante el desarrollo del sistema nervioso. La naturaleza de estas señales es múltiple e incluye miembros de prácticamente todas las familias de factores de señalización. Durante el desarrollo embrionario, la combinación de estas señales reguladas tanto temporal como espacialmente, determinan la capacidad de proliferación o de diferenciación celular.

Entre los factores secretados que controlan ambos procesos se presentará el análisis genético de la vía de señalización de Wnt y se discutirá su papel dual en el control de la proliferación y la diferenciación de los precursores neurales en la generación de neuronas.

Entre los factores intrínsecos celulares, se discutirá el papel de otros elementos integradores de señales, como quinasas, en el control de la decisión entre proliferación y diferenciación.

2

CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE LA CRESTA NEURAL

Pardal R

Department of Cell and Developmental Biology, University of Michigan, USA

Las células madre son capaces de autopropagarse y diferenciarse para dar lugar a distintos tipos celulares. Durante el desarrollo del embrión, y en menor medida en la vida adulta, pueden encontrarse células madre específicas de tejido. Estas células poseen un potencial de diferenciación

limitado y desempeñan un importante papel en el desarrollo, crecimiento y reparación del tejido. Las células madre derivadas de la cresta neural constituyen uno de estos tipos celulares, en este caso responsables de dar lugar al sistema nervioso periférico. Estas células han sido caracterizadas en ratas, hasta bien entrada la edad adulta, en lugares como el sistema nervioso entérico, donde podrían desencadenar neurogénesis tras situaciones de estrés y/o lesión.

El estudio de los mecanismos de diferenciación y autopropagación de estas células es esencial para su uso terapéutico y para dilucidar su implicación en el desarrollo de enfermedades. La ruta de control del ciclo celular por las proteínas Rb está implicada en el desarrollo de varios tipos de cáncer. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran la importancia de esta ruta en la regulación específica de la autopropagación de las células madre, sin afectar la proliferación de progenitores derivados de ellas. Nuestros datos apoyan la existencia de células madre cancerosas responsables del crecimiento de los tumores, y originadas por la desregulación de la división celular de células madre específicas de tejido.

3

ESTABLECIMIENTO DEL PATRÓN DORSO/VENTRAL EN EL TUBO NEURAL DE VERTEBRADOS

Martí E

Instituto de Biología Molecular de Barcelona CID-CSIC, Barcelona

El patrón dorso/ventral del tubo neural se establece mediante la actividad de dos centros señalizadores extrínsecos al SNC que ejercen actividades opuestas. Las neuronas dorsales se diferencian en respuesta a la actividad de proteínas de la familia de los TGF β (BMPs y activinas) que secretadas desde el ectodermo no-neural ejercen su actividad sobre el tubo neural dorsal. Esta actividad «dorsalizante» se traduce en la generación de seis tipos de precursores de interneuronas (dP1-6) a partir de los cuales derivan las interneuronas dorsales (dI1-6). Las neuronas ventrales, por su parte, se diferencian en respuesta a *Sonic hedgehog* (Shh) que secretado desde la notocorda y desde la placa del suelo, ejerce su actividad en la mitad ventral del tubo. Shh actúa mediante la creación de un gradiente de proteína que se traduce en la determinación de cinco poblaciones de precursores (pMN, p0-3) que se diferencian en cinco tipos distintos de neuronas ventrales (V3, motoneuronas, V2, V1, V0). Este proceso de determinación y generación de neuronas espinales se lleva a cabo al tiempo que el número de precursores aumenta gracias a una activa proliferación mediada por proteínas de la familia de los Wnts. Utilizando un sistema in vivo intentamos entender cómo los precursores neurales son capaces de leer e interpretar esta información y de traducirla en la generación de los fenotipos correctos, en los lugares adecuados y en la cantidad precisa para la construcción de una médula espinal funcional.

4

MECANISMOS DE MIGRACIÓN TANGENCIAL EN EL TELENCEFALO

Marín O

*Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández -CSIC.
San Juan de Alicante*

Durante el desarrollo del sistema nervioso central las neuronas alcanzan su posición definitiva siguiendo dos mecanismos fundamentales de desplazamiento: (i) la migración radial, en la que las neuronas utilizan las prolongaciones de la glía radial como guía, y (ii) la migración tangencial, en la que las neuronas migran perpendicularmente al eje definido por la glía radial y no dependen por lo tanto de ella para su movimiento. En el telencéfalo, por ejemplo, estos dos mecanismos de migración se coordinan de forma precisa para dar lugar a la corteza

cerebral. Así, las neuronas de proyección de la corteza cerebral migran en su mayor parte siguiendo las prolongaciones de la glía radial, mientras que la mayoría de las interneuronas corticales proceden del telencéfalo basal y alcanzan su posición definitiva a través de una larga migración tangencial.

Nuestro laboratorio persigue comprender los mecanismos celulares y moleculares que controlan la migración tangencial de las interneuronas corticales. En contraste con lo que parece ocurrir durante la migración radial, la migración tangencial de las interneuronas corticales parece estar controlada por los mismos mecanismos que controlan la guía axonal: atracción y repulsión por contacto o a distancia (mediante moléculas difusibles). En este seminario resumiré nuestra visión actual de estos mecanismos así como de las moléculas implicadas en el control de la migración tangencial de las interneuronas corticales.

S11. Las células gliales. Su origen e importancia para la supervivencia neuronal

Coordinadora: Ángeles Rodríguez-Peña

1

MOLECULAR CONTROL OF OLIGODENDROCYTE PRECURSOR CELL MIGRATION IN THE EMBRYONIC OPTIC NERVE

Le Bras B^a, Prestoz L^a, Spassky N^a, Chatzopoulou E^a, De Castro F^b, Heydon K^a, Zalc B^a, Thomas JL^a

^aINSERM. U495, IFR Neurosciences, Hôpital de la Salpêtrière. Paris, France.

^bInstituto de Neurociencias de Castilla y León-INCYL, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, España

Our goal is to identify the molecular cues governing the migration of oligodendroglial cells in the embryonic brain. The expected findings resulting from these studies might provide new insights upon the mechanisms of recolonisation of demyelinating lesions by oligodendrocyte precursor cells (OPCs). Using the optic nerve of plp-lacZ or plp-GFP embryos as an experimental system, we have started a program to examine the role of secreted factors and contact molecules known to be implicated in neuronal cell movement. First, we have described the spatio-temporal pattern of expression of class 3 semaphorins and netrin-1 ligands and receptors and selected the secreted factors Sema 3A, Sema 3F and netrin-1 for their tropic effects on OPCs. Second, we have focused on the contact molecules ephrins and Eph receptors. Based on the expression of Eph receptors by the axons of retinal ganglionic cells, we have examined the expression of ephrin ligands by optic nerve OPCs. We have selected the ligand ephrin B2 for functional studies based on stripe-assays and time-laps experiments. The optic nerve OPCs specifically increased their adherence and strongly reduced their migration rate on EphB substrate, suggesting that a reverse ephrinB2 signaling results in a stop signal for OPC migration in the optic nerve. These data lead now to explore a possible regulation by ephrins of chemotrophic factors acting on optic nerve OPCs, like Sema 3A, Sema 3F or netrin-1.

2

RESPUESTA DEL ASTROCITO A LA LESIÓN CEREBRAL

Planas AM

Departament de Farmacologia i Toxicologia, IIBB-CSIC, IDIBAPS

Los astrocitos dan soporte trófico a las neuronas. En lesiones cerebrales contribuyen al desarrollo de edema mediando el flujo de agua desde el espacio vascular. Los astrocitos poseen excitabilidad basada en cambios dinámicos en el calcio citosólico. Se hipotetiza que esta señalización por calcio podría ser la base de la 'despolarización propagativa' que se

produce en la isquemia y que es evocada por la aplicación local de KCl o glutamato y por estimulación eléctrica.

La recaptación de glutamato por el transportador astroglial juega un papel importante en las sinapsis glutamatérgicas y tiene relevancia cuando se produce liberación masiva de glutamato. La recaptación de glutamato estimula el consumo de glucosa y la liberación de lactato en los astrocitos, y se propone que los transportadores gliales de glutamato median la interacción metabólica funcional entre neuronas y astrocitos.

Los astrocitos liberan factores neurotróficos que son neutroprotectores en fase aguda de lesión y son una defensa antioxidante, pero también son vulnerables al estrés oxidativo. La astrogliosis es muy sensible su entorno y reacciona con una transformación reactiva que implica cambios metabólicos, de señalización y expresión génica, y fenotípicos que comportan una hipertrofia celular. Los astrocitos reactivos contribuyen a la formación de la cicatriz glial que rodea la zona necrosada, lo cual obstaculiza la regeneración.

Agradecimientos: CICYT (SAF02-01963)

3

ROLE OF MICROGLIA IN NEURONAL DEATH

Mallat M

INSERM U.495, Hôpital de la Salpêtrière. Paris, France

Neuronal cell death during development and in pathologies is associated with the recruitment of amoeboid microglia, a cell population which belongs to the mononuclear phagocyte lineage. These cells participate in the elimination of cell debris through their phagocytic behaviour. Besides this scavenger role, evidence provided in the last decade suggests that microglia actively contribute to cell interactions which favor, or conversely prevent the commitment of neurons to death. This talk will discuss the involvement of microglial cells in the developmental death affecting cells from the neuronal lineage at different maturation stages. A possible link between the phagocytic behavior of microglia and the execution of neuronal death program will be considered in light of the engulfment promoted cell death that was recently demonstrated in the developing nematode. The role of microglial cells will also be raised in the context of Alzheimer disease, during which the extracellular release of fibrillogenic amyloid peptides are thought to trigger neuronal degeneration.

4

DIFERENCIACIÓN DE LA CÉLULA DE MÜLLER

Prada F^a, Aguilera Y^a, Quesada A^a, Santano C^b, López R^b, Prada C^b

^aDepartamento de Anatomía. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

^bDepartamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

La célula de Müller es la glia mayoritaria de la retina de los vertebrados. Es glia radial y una de las células de citoarquitectura más compleja del sistema nervioso central (SNC). Realiza funciones de los astrocitos cerebrales y de la microglia, y hay evidencias de que se comporta como oligodendrocito, participando en la mielinización de los axones de las células ganglionares en su trayecto dentro de la retina. Recientemente se ha propuesto como célula madre de la retina adulta. Sin embargo, el completo entendimiento de la diferenciación de esta célula incluye comprender cómo diferencia sus dominios morfofuncionales y cómo adquiere sus diferentes capacidades funcionales a lo largo del desarrollo.

En nuestro laboratorio hemos investigado en la retina de pollo principalmente sobre su morfogénesis y su diferenciación funcional como astrocito, pero recientemente hemos abordado su papel en la mielinización intraretina en diversas especies de vertebrados incluido el hombre.

Nuestros resultados muestran que la diferenciación de los distintos dominios morfofuncionales tiene lugar por tres mecanismos distintos, uno de ellos hasta ahora desconocido, en los que participan diferentes moléculas del citoesqueleto. La capacidad funcional como astrocito la adquiere siguiendo los gradientes de gliogénesis y, en contra de lo establecido, esta diferenciación continúa durante el primer mes de vida. Las células de Müller de las retinas mielinizadas expresan MOSP, proteína específica de mielina y oligodendrocitos, y su expresión se inicia precisamente con el inicio de la mielinización y se concentra en el dominio de interacción con los axones de las células ganglionares.

S12. Mecanismos moleculares de la secreción

Coordinador: Jordi Marsal

1

¿ES EL RECICLADO RÁPIDO DE VESÍCULAS SINÁPTICAS EQUIVALENTE AL MECANISMO DE KISS & RUN?

Álvarez de Toledo G, Tabares L

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla

La exocitosis mediada por *kiss-and-run* es rápida y muy eficaz para producir la liberación de neurotransmisores al espacio extracelular a través de la formación transitoria de un poro de fusión. Durante el *kiss-and-run* la membrana vesicular mantiene su identidad, ya que no se produce el colapso de dicha membrana con la membrana plasmática. Durante este proceso la vesícula de secreción mantiene su identidad y posición, pudiendo realizar potencialmente una segunda fusión tras el estímulo para la secreción. En experimentos previos, encontramos que la incidencia de eventos de *kiss-and-run* se incrementa a medida que se aumenta la concentración extracelular de Ca^{2+} en el rango de milimoles (Ales et al. Nat Cell Biol 1999; 1: 40-4). Estos eventos duran milisegundos, por lo que fueron denominados *fast kiss-and-run*, y liberan la misma cantidad de transmisor que una exocitosis convencional. Hemos hecho experimentos de *patch-clamp* y amperometría para demostrar si el efecto de los iones de calcio se realiza directamente desde el exterior o es mediado por cambios $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La incidencia de *fast kiss-and-run* no se modificó con $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mientras que si se observaron al incrementar el Ca^{2+} de 2 a 20 mM. Por tanto los eventos de *fast kiss-and-run* son una acción directa de los niveles de calcio extracelular.

2

FUNCIONES MÚLTIPLES DE PROTEÍNAS SNARE SENSIBLES A NEUROTOXINA BOTULÍNICA

Blasi J

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular. Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica. Campus de Bellvitge. Universidad de Barcelona

Las proteínas SNARE (sinaptobrevina/VAMP en la vesícula sináptica, y SNAP-25 y syntaxina en la membrana presináptica) forman un complejo que es necesario para la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica. La importancia de estas proteínas se hizo patente cuando se demostró que eran las dianas moleculares de las neurotoxinas clostridiales con actividad metaloproteasa específica.

Además de intervenir directamente en la neurosecreción, las proteínas SNARE localizadas en la membrana plasmática participan en otros procesos celulares. La transfección de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con la neurotoxina botulínica de tipo A y C1 nos ha permitido obtener clones funcionalmente deficientes de SNAP-25 y syntaxina. Esto nos ha permitido estudiar algunas de las funciones de las proteínas

SNARE además de la neurosecreción. Los resultados muestran que estas proteínas intervienen en la elongación de neuritas durante la diferenciación celular y que syntaxina es esencial para la supervivencia de la célula diferenciada.

Además, utilizando ovocitos de *Xenopus* como modelo biológico, hemos podido estudiar el papel modulador de la syntaxina en corrientes estimuladas por concentraciones bajas de calcio extracelular. Globalmente, estos resultados indican que las proteínas SNARE localizadas en la membrana plasmática participan en más de un proceso celular, posiblemente favoreciendo la coordinación entre ellos.

3

ROLE OF INTERNAL MATRIX IN SYNAPTIC VESICLES

Solsona C

Dept. Biologia Cel.lular i Anatomia Patològica. Laboratori de Neurobiologia Cel.lular i Molecular. Facultat de Medicina. Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona.

According to their light appearance, under the electron microscope, synaptic vesicles are believed to be like a cell membrane balloon filled with an aqueous solution enriched in neurotransmitters. Cholinergic synaptic vesicles contain acetylcholine in a concentration around 1 M and, in addition, they contain ATP in a concentration between 100-200 mM. These high solute concentrations would result in a hypertonic solution that will blow up synaptic vesicles and this is not the case. Most of the secretory granules, in secretory epithelia and other secretory cells, contain an intragranular matrix that adsorbs small molecules by electrostatic interactions. The experimental model of mast cells has been extensively used to understand such interactions. An intragranular matrix is also present in chromaffin cells, which are closely related to neurons. Our laboratory has found that synaptic vesicles, like the other secretory granules have an intravesicular matrix that binds the 95% of the content of neurotransmitters into the vesicles. The results obtained confirm a general rule in biology: cellular mechanisms and processes are conserved among cells and animal species.

This work is supported by grants from MCyT, CIRIT, and Fundació La Marató de TV3.

4

ION CHANNELS IN SECRETORY GRANULES OF THE PANCREAS: MOLECULAR IDENTIFICATION AND THEIR ROLE IN REGULATED SECRETION

Thévenod F

Dep. Physiology & Pathophysiology of Medicine, Univ. Witten/Herdecke. Witten, Germany

Regulated secretion occurring through granule exocytosis and release of stored small organic molecules and proteins is inherent to a variety of exocrine and neuroendocrine cells and tissues. «Exocytosis» refers to a phase of secretion where an electrical continuity of granule and plasma membrane prevails and the access of the granule content to the cell exterior is not anymore impeded by a cellular membrane. In recent years, major progress has been made in the understanding of exocytotic secretion following the development of biophysical techniques with high temporal and spatial resolution as well as the identification of Ca^{2+} -dependent an-independent «docking» and «fusion» proteins involved in exocytosis. Prior to exocytosis, the granules undergo a «docking» reaction at specific release sites, which involves the binding of several granule- and plasma membrane-associated complementary proteins. This is followed by a «priming» reaction, a process requiring metabolic energy and providing competence of docked granules for membrane fusion and exocytosis. A specific signal, e.g. an increase of cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$, stimulates exocytosis, which is then followed by the

release of the granule matrix, a process triggered by specific signaling molecules, temporally distinct from and also not obligatorily coupled to exocytosis.

The molecular cloning of several families of ion channel proteins, which include putative intracellular ion channels, has revived interest in the role of ion flux through secretory granule channels for exocytotic secretion. There is now mounting evidence that cation and anion fluxes across granule membranes occur via specific ion channels, suggesting that a «chemiosmotic» process may be operative at particular stages during to the sequence of events associated with protein secretion in exo- or endocrine cells. Recent studies indicate that pancreatic acinar cells secretory (zymogen) granules express a CIC-2 Cl channel, a HCO_3^- -permeable member of the CLCA Ca^{2+} -dependent anion channel family, and a KCNQ1 K^+ channel. These ion channels appear to control secretagogue-induced release of digestive enzymes and to keep the morphological integrity of exocytosed granules required for «kiss-and-run» recycling. Pancreatic beta-cell granules express a CIC-3 Cl channel, which provides a shunt pathway for granule acidification by a vacuolar-type H^+ -ATPase. Their combined action promotes «priming» of secretory granules, which gain competence for Ca^{2+} -dependent exocytosis triggered by sulfonylureas.

Thus, secretory granules are equipped with specific sets of ion channels that modulate regulated exocytosis and release of macromolecular secretory products. Granule ion channels could therefore represent ideal targets for the development of specific therapeutic drugs controlling exocytotic secretion in disease processes, such as acute pancreatitis, cystic fibrosis, and non-insulin-dependent diabetes mellitus.

S13. Bancos de tejidos neurológicos

Coordinador: Isidro Ferrer

1

INTRODUCCIÓN. ORGANIZACIÓN Y MANEJO DE LOS BANCOS DE TEJIDOS NEUROLÓGICOS HUMANOS Ferrer I

Instituto de Neuropatología. Hospital de Bellvitge. Barcelona

2

EMPLEO DE HERRAMIENTAS DE GENÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS PARA LA DEPRESIÓN MAYOR

Martínez A^a, Arteta D^{a,c}, Junquera C^a, Osaba L^a, Simón L^a, Morón JA^a, Morentín B^b, Meana JJ^c

^a Medplant Genetics. Vizcaya. ^b Instituto Vasco de Medicina Legal.

^c Departamento de Farmacología UPV/EHU

La tecnología del microarray de ADN ha supuesto un cambio radical en la investigación molecular de enfermedades complejas al permitir analizar la expresión simultánea de miles de genes. Con el objetivo de mejorar el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la etiología de la depresión, hemos aplicado esta tecnología para estudiar los perfiles de expresión génica en tejido cerebral *post-mortem* de pacientes diagnosticados de depresión mayor.

El tejido cerebral *post-mortem* humano es un modelo muy valioso para el estudio de enfermedades psiquiátricas y neurológicas de etiología desconocida. La existencia de un banco de tejidos cerebrales en el Instituto Vasco de Medicina Legal, con protocolos estandarizados de selección de muestras, verificación del diagnóstico clínico, neuropatológico y toxicológico, disponibilidad de controles y muestras representativas de edad y sexo, supuso una oportunidad única para investigar las anomalías génicas asociadas a la enfermedad.

Hemos analizado más 35 muestras empleado el Genechip Human Genome U133 Set de Affymetrix. Este *set* de dos microarrays permite el análisis de la expresión de 40.000 transcritos, incluyendo genes anotados, ESTs, variantes de *splicing* y distintas señales de poliadenilación. Los diferentes controles empleados para medir la integridad del RNAm o el número y tipo de genes presentes, permitieron concluir que muestras con hasta 50 horas de período *post-mortem* eran válidas para estudios de expresión génica. Esta metodología nos ha permitido describir el efecto sobre los niveles de expresión de genes y rutas funcionales, tales como factores neurotróficos y rutas de transducción de señales, en la depresión mayor.

Proyecto financiado por MCYT (02/10370E) y Gobierno Vasco (Intek ER02ME04)

3

EMPLEO DE PLATAFORMAS GENÓMICAS EN ANÁLISIS GENÉTICOS DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Buesa C

Director de Oryzon Genomics. Parque Científico de Barcelona

El progresivo envejecimiento de las poblaciones europeas provoca un incremento notable de la incidencia de patologías neurodegenerativas con el consiguiente carga en la gestión de los sistemas públicos de salud. Entre ellas destacan patologías con fronteras moleculares no siempre bien definidas como la enfermedad de Alzheimer, la demencia de cuerpos de Lewy difusa, y la enfermedad de Pick entre otras. Por este motivo, se están realizando esfuerzos progresivos para desarrollar herramientas diagnósticas más precisas y sensibles y que además permitan detectar nuevos paradigmas terapéuticos. En esta búsqueda, la genómica funcional presenta un enorme potencial a la hora de evaluar el subconjunto del transcriptoma cuya actividad es específica o común a los cerebros con determinadas patologías. Además permite interrogarnos sobre las diferentes variedades de *splicing* específicas de tejido, así como de su papel marcador o etiológico en diferentes patologías.

Este estudio muestra la variabilidad de un subconjunto de genes predefinido como relevantes en procesos neurodegenerativos representativos y de su posible agregación. Las muestras, obtenidas de autopsias bien caracterizadas han sido analizadas mediante chips de oligonucleótidos de DNA sintetizados a medida.

4

UTILIZACIÓN DE HERRAMIENTAS DE PROTEÓMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN ALTERACIONES AFECTIVAS

Espuña G^a, Santa Cruz S^a, Arteta D^b, Callado L^c, Meana J^c, Martínez A^b, Morón JA^a

^a Proteomika SL, Parc Científic de Barcelona. Barcelona. ^b Medplant Genetics SL. Barakaldo, Bizkaia. ^c Departamento de Farmacología, Universidad del País Vasco. Leioa, Bizkaia

La depresión mayor es la principal causa de discapacidad con un 10% de Europeos y aproximadamente un 3-5% de casos diagnosticados en la población española. Se cree que las alteraciones de los receptores serotoninérgicos y/o noradrenérgicos, así como sus vías de transducción de señal juegan un papel principal en la patogénesis de la depresión o, de forma alternativa, podrían representar un efecto adaptativo en respuesta a otras alteraciones de tipo neuroquímico. Los nuevos antidepresivos, tales como los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, suelen provocar un menor número de efectos secundarios que los antidepresivos de la primera generación, que incluyen los antidepresivos tricíclicos y los inhibidores de la monoamino oxidasa. A pesar de que hay un amplio abanico de fármacos antidepresivos, las respuestas individuales

a cada tipo de tratamiento varían de forma considerable y, por tanto, es necesario encontrar nuevas terapias con una mayor eficacia y un menor número de efectos secundarios.

El principal objetivo de este proyecto es el desarrollo de nuevas terapias mediante un proceso de búsqueda de nuevos fármacos dirigidos a dianas específicas. El presente estudio está basado en la utilización de una colección única de cerebros proporcionada por el Instituto Anatómico Forense (Instituto Vasco de Medicina Legal), y clasificada de acuerdo a características demográficas (género, edad), intervalo *post-mortem*, diagnóstico psiquiátrico (depresión mayor, trastorno bipolar, esquizofrenia) e historial clínico.

Nuestra búsqueda de dianas potenciales para su aplicación terapéutica se basa en la electroforesis bidimensional, una técnica capaz de detectar la mayor parte de las proteínas expresadas en un tejido determinado. Acoplada con la espectrometría de masas, la electroforesis bidimensional constituye una metodología valiosa para el análisis cualitativo y cuantitativo de la expresión proteica. De esta forma, es posible determinar cambios en expresión proteica asociados con las alteraciones neurológicas en estudio.

Subvencionado por el MCYT (02/10370E) y el Gobierno Vasco (Intek ER02ME04)

5

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN MUESTRAS DE TEJIDOS NEUROLÓGICOS DE BANCOS DE TEJIDOS: FOSFORILACIÓN DE TAU EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y EN OTRAS TAUPATÍAS

Puig B

Instituto de Neuropatología, Hospital de Bellvitge

La hiperfosforilación anormal de la proteína tau y los depósitos en forma de hilillos del neuropilo (NFT) y de cuerpos de Pick (CPi) son las lesiones neuropatológicas características de la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Pick (EPi). Estos acúmulos están asociados a kinasas de estrés como la p-38 y la kinasa terminal c-jun (SAPK/JNK), que tienen la capacidad de fosforilar tau *in vitro*. En el presente estudio se demostró un incremento tanto de SAPK/JNK como de p-38 en fracciones enriquecidas con filamentos anormales de tau (fracciones sarkosil insolubles) tanto en EA como EPi utilizando muestras con unos tiempos *post-mortem* de 1-2 horas. Se encontró inmunorreactividad para SAPK/JNK en un 40% de neuronas con NFTs y en un 30% de neuronas con CPi. p-38 se encontró en un 70% de neuronas con NFTs y 80% de neuronas con CPi, no hallándose células positivas en los cerebros control. Se demostró también que tanto p-38 como SAPK/JNK inmunoprecipitadas de las fracciones sarkosil-insolubles tenían capacidad para fosforilar sus sustratos específicos (ATF-2 y c-jun), y sobre todo, capacidad para fosforilar tau recombinante en diferentes lugares específicos. Estos estudios indican que las kinasas de estrés se expresan en un alto porcentaje en las NFTs como en los CPi, posiblemente favoreciendo y perpetuando la hiperfosforilación de tau en EA y EPi.

S14. Modelos transgénicos para estudio de la función neuronal

Coordinador: J.R. Naranjo

1

MODELOS MURINOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS COMO APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA PATOGENIA DEL RETRASO MENTAL

Dierssen M

Programa Genes y Enfermedad, Centro de Regulación Genómica. Barcelona

Las bases neuropatológicas del retraso mental en las personas con síndrome de Down no son conocidas. Se ha argumentado que la disgenesia dendrítica sea responsable de la disfunción cognitiva, que derivaría de un desarrollo anómalo y una función cerebral alterada en el adulto. La disponibilidad de un modelo murino con trisomía parcial de MMU16, homólogo al HSA21 humano, el ratón Ts65Dn, permite estudiar la microestructura de la corteza cerebral en esta enfermedad genética y la posible influencia del enriquecimiento ambiental a este nivel. Nuestros resultados demuestran que la microarquitectura de la corteza cerebral presenta alteraciones importantes en los ratones Ts65Dn, caracterizadas por una reducción del tamaño del árbol dendrítico basal, que es además menos rico en ramificaciones. Ello conlleva una reducción significativa tanto en el número de espinas dendríticas como en la distribución de las mismas. Las diferencias encontradas en el número de espinas reflejan alteraciones en la capacidad de procesamiento de la información. El enriquecimiento ambiental produjo un marcado efecto en animales control, incrementando el número de ramificaciones y espinas dendríticas con respecto a los no enriquecidos. Sin embargo, prácticamente no modificó la estructura de las células piramidales en los animales trisómicos, sugiriendo que el grado de plasticidad cerebral del modelo Ts65Dn es considerablemente menor que el de los animales no trisómicos, y por tanto la mejoría conductual que se ha descrito tras el enriquecimiento ambiental no responde a cambios neuroanatómicos estables. Por otro lado, las alteraciones conductuales observadas en Ts65Dn podrían ser debidas a un desarrollo anormal de la circuitería cerebral a nivel cortical.

Fundación Jérôme Lejeune.

2

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE RATONES TRANSGÉNICOS SOBREEXPRESANDO DN-DREAM EN NEURONAS

Jefferys J

University of Birmingham. División Neuroscience. Birmingham, UK.

3

TRANSGENIC MODELS FOR DIAGNOSIS OF TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES

Pintado B^a, Castilla J^b, Gutiérrez-Adán A^a, Brun A^b, Ramírez MA^a, Salguero FJ^b, Parra B^b, Torres JM^b

^a Departamento de Reproducción Animal, INIA. Madrid.

^b Centro de Investigación en Sanidad Animal, INIA. Valdeolmos, Madrid

Prion mediated encephalopathies (TSEs) have gained remarkable attention since the outbreak of BSE in Great Britain and the consequent appearance of a new variant of Creutzfeld-Jakob disease in humans. Diagnosis of these diseases is based on clinical symptoms, prion detection by western blot and post-mortem histopathological findings in the brain. Even though prion diseases are now among the best understood of brain degenerative diseases, there is still a need for the development of a reliable diagnostic assay that enables early detection of infected animals or healthy carriers in order to avoid their inclusion in the human food chain.

To date, only very advanced preclinical stages can be diagnoses based on prion accumulation in the CNS. The only reliable diagnostic test for infectious materials is based on inoculation of mice, which develop disease after very long incubation periods. We have addressed this problem by creating transgenic mouse models that avoid the species-specific barrier responsible of both the long incubation time and the occurrence of sub clinical forms that may evade current diagnostic methods. In order to evaluate the possible transmission to other species, mice expressing the porcine PrP were also designed and infected with BSE material. Human models with polymorphism at codon 129 are also being produced.

Transgenic mice expressing polymorphic variations of the bovine PrP in absence of the endogenous mouse PrP protein were generated by pronuclear microinjection. Lines with 6 (Bo6ORTg) or 7 (Bo7ORTgs) octarepeats were characterized and different expression levels within each construct were selected. After exposing hemizygous and homozygous animals to infective inoculums, kinetics of appearance of histochemical, anatomopathological and clinical signs of disease were characterized. Presence of an extra octapeptide (Bo7ORTg) reduced consistently incubation periods. Infective material was detected in 80% of mice at 120 post inoculation compared to the 630 days of non transgenic mice or the 350 days of mice carrying the wild type bovine gene (Bo6ORTg). Some transgenic lines over expressing mutated bovine PrP or porcine PrP showed some clinical signs without the appearance of proteinase resistant PrP, a distinctive sign of the disease. To address whether a sub clinical form of TSE that evaded diagnostic tools was being developed, second passes of brain homogenates from these mice are under study.

4

ESTUDIO DEL MECANISMO PATOGENICO EN UN MODELO TRANSGÉNICO CONDICIONAL DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Díaz-Hernández M^a, Martín-Aparicio E^a, Ortega Z^a, Gómez R^a, Abarca-Salvatori A^a, Gómez-Ramos P^b, Morán A^b, Ávila J^a, Hernández F^a, Lucas JJ^a

^a Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC/UAM. ^b Departamento de Morfología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid

La enfermedad de Huntington (EH) es una patología neurodegenerativa hereditaria que cursa con trastornos del movimiento, depresión, demencia y que conduce a la muerte del paciente en un periodo de tiempo de 10-20 años. La EH está causada por la expansión de tripletes CAG que codifican para una secuencia de poliglutaminas en una proteína de función desconocida denominada huntintina (htt).

En nuestro laboratorio hemos generado un modelo animal que expresa el extremo N-terminal de la htt con 94 repeticiones de CAG. Este ratón, denominado HD94, reproduce la neuropatología y sintomatología motora característica de la enfermedad. Los ratones HD94 al tener la peculiaridad de haber sido generados con un sistema transgénico condicional han permitido demostrar que la sintomatología motora y la neuropatología son reversibles al menos en sus estadios más tempranos (Cell 2000; 101: 57-66). Además, este modelo ha permitido demostrar que la sintomatología cursa sin pérdida de neuronas estriatales, sugiriendo que al menos en los estadios iniciales, la enfermedad se debe a una disfunción neuronal (J Neurosci 2001; 21: 8772-81) previa a la pérdida neuronal.

En la actualidad nos encontramos explorando varios aspectos de la enfermedad como son: la posible reversibilidad en estadios más avanzados de la patología, la posible relevancia de la ruta ubiquitina-proteosoma como causa de la disfunción neuronal, la naturaleza química de los agregados, así como posibles nuevas estrategias terapéuticas.

5

**TRANSGENIC APPROACHES
TO DISSECTING HYPOCRETIN FUNCTION**

De Lecea L

*Department of Molecular Biology,**The Scripps Research Institute. La Jolla, CA, USA*

The hypocretins (hcrts), also known as orexins, are two recently described peptides derived from the same precursor and produced in a few thousand cells in the lateral hypothalamus that project widely throughout the brain. Initially they were thought to modulate food intake and energy balance, and they have now been shown to play a crucial role in arousal. Infusion of the hypocretin peptides has many additional effects including increase in blood pressure, inhibition of LH release, analgesia, stereotyped behavior and learning. The role of hypocretinergic neurons in energy homeostasis has recently been demonstrated in transgenic mice that lack hcrts neurons, which are hyperphagic and obese. In spite of the abundant information about the physiological effects of the

peptides, the signals that regulate hypocretin neurons remain largely unknown. Our core hypothesis is that hcrts neurons integrate physiological information from different circuits, which involve afferent connections from the arcuate, geniculate thalamus and cortical areas, to modulate energy homeostasis and arousal. We are conducting a systematic hypocretin-specific retrograde tracing by infecting a recombinant strain of pseudorabies virus in transgenic mice that express the cre recombinase under the control of the hypocretin promoter. Some of the inputs are being tested functionally in transgenic mice expressing cameleons and pericams in hypocretin neurons. The cameleons are recombinant calcium indicators that can monitor changes in intracellular calcium concentration by FRET of blue and yellow fluorescent proteins. Hypothalamic slices of cameleon or pericam transgenic mice are being tested for excitation by conventional and peptide transmitters. The results from these experiments will give new information about the regulators of hypocretin neurons, and by extension, of the modulation of energy homeostasis. In addition, these studies may yield new lead compounds that regulate hypocretin activity which may be useful as therapeutic agents for sleep and eating disorders.

COMUNICACIONES ORALES

Glía

Moderadores: A. García y M. Nieto-Sampedro

O 1

NUEVO MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MICROGLÍA DE RATÓN CON ALTO RENDIMIENTO

Saura J^a, Tusell JM^{a,b}, Serratos J^a

^a Departamento de Farmacología y Toxicología. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-CSIC, IDIBAPS. ^b Departamento de Neuroquímica. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-CSIC, IDIBAPS.

Muchas características de la microglía se han podido conocer a partir de estudios con cultivos primarios. El método clásico para obtener microglía de rata o ratón se basa en una fuerte y prolongada agitación (*shaking*) de los frascos de cultivo gliales. Se obtiene microglía muy pura (>95%). Sin embargo, para tener un rendimiento alto se requiere el sacrificio de muchos animales. Por ello, intentamos optimizar las condiciones para preparar cultivos primarios de microglía de ratón. Hemos observado que cuando un cultivo mixto de glía de ratón se tripsiniza suavemente en presencia de calcio, se desprende una película de células que se separa de otra capa celular que queda adherida en el fondo del pozo de cultivo. Las células adheridas pueden ser cultivadas durante semanas. Con marcadores específicos hemos comprobado que la mayoría de estas células son microgliales (>95%). Las pocas células contaminantes son pericitos y muy raramente astrocitos. La microglía así obtenida puede activarse: el LPS induce morfología ameboide, fagocitosis, producción de NO y de TNF α y translocación al núcleo del NF κ B. El M-CSF induce su ramificación y proliferación. Debido a que el rendimiento es superior (5 a 10 veces más) al del método clásico y a que las células obtenidas son funcionalmente comparables, proponemos este protocolo como una alternativa muy ventajosa para el cultivo de microglía.

Financiación: CICYT (SAF 2001-2240). Josep Saura posee un contrato Ramón y Cajal del MCYT.

O 2

REGULACIÓN SINÁPTICA DEL Ca²⁺ INTRACELULAR EN ASTROCITOS: INTEGRACIÓN DE INFORMACIÓN SINÁPTICA POR ASTROCITOS

Perea G, Araque A

Instituto Cajal, CSIC, Madrid

Astrocitos de *stratum oriens* de hipocampo de rata responden a la estimulación del *alveus* con corrientes debidas a transportadores de Glu y aumentos de Ca²⁺ mediados por receptores de ACh pero no de Glu (Araque et al. J Neurosci 2002).

Hemos investigado: 1) si los receptores de Glu expresados por astrocitos son activados por las colaterales de Schaffer (CS); 2) las respuestas astrocitarias a la actividad de CS y *alveus*.

La estimulación de CS genera corrientes de entrada y aumentos de Ca²⁺, sensibles a inhibidores de transportadores y de receptores de Glu, respectivamente, y sensibles a 4AP, TTX y Cd²⁺, indicando que se deben a Glu liberado sinápticamente. La corriente evocada por estimulación simultánea de *alveus* y CS es igual a la suma de las evocadas

independientemente, indicando que la liberación de Glu no está modificada. La estimulación simultánea genera un aumento de Ca²⁺ menor que la suma de los evocados independientemente. La ionoforesis simultánea de Glu y ACh genera un aumento de Ca²⁺ menor que la suma de los evocados por aplicación independiente, indicando que esta no linealidad se debe a propiedades intrínsecas de los astrocitos. Por tanto, los astrocitos presentan dominios funcionales que discriminan la actividad de distintas terminales sinápticas. La señal de Ca²⁺ astrocitaria es modulada por distintas aferencias sinápticas. Los astrocitos poseen propiedades integradoras de la información sináptica.

Financiación: MCYT (BFI2001-0206). GP es becaria predoctoral del CSIC.

O 3

INHIBICIÓN DE LA GUANILIL CICLASA SENSIBLE A NO DURANTE LA NEUROINFLAMACIÓN

Baltrons MA, Pedraza CE, Sardón T, Pifarré P, Heneka M, García A
Instituto de Biotecnología y Biomedicina V. Villar Palasí y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona

Utilizando cultivos primarios enriquecidos en astrogliá de cerebro de rata hemos demostrado previamente que el tratamiento prolongado con agentes neuroinflamatorios, como LPS, IL-1 β , TNF- α o péptidos β -amiloides, inductores de reactividad glial y de expresión de NO sintasa, produce una disminución de la actividad y de la concentración de la guanilil ciclasa soluble (sGC), receptor fisiológico del NO. En este trabajo demostramos que durante las primeras 20 h, la disminución de la concentración de sGC es más rápida en células tratadas con LPS o IL-1 β que con cicloheximida, indicando que esos agentes disminuyen la vida media del enzima. Este efecto es independiente de NO, requiere transcripción y síntesis de proteínas y es impedido por inhibidores de MAPKs (ERK1/2; p38). El tratamiento con los compuestos inflamatorios produce además una disminución del mRNA de las subunidades de la sGC que es dependiente de NO, de acuerdo con lo observado en células tratadas de forma prolongada con donadores de NO. La disminución en los niveles de proteína y de mRNA de la sGC también se observa en cerebro de rata adulta 24 h después de la inyección intracraneal de IL-1 β o LPS. El efecto de los agentes inflamatorios no es específico de rata ya que en cultivos enriquecidos en astrocitos de cerebro fetal humano el tratamiento con IL-1 β o interferón- γ también disminuye la capacidad de generar cGMP en respuesta a NO. Financiado por SAF 2001-2540 y SGR 2001-212.

O 4

LA RETIRADA DE SUERO SENSIBILIZA LOS ASTROCITOS A ESTRÉS OXIDATIVO MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NOVO DE CERAMIDA

Carracedo A, Geelen MJH, Guzmán M, Velasco G

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid

Puesto que se ha sugerido que el esfingolípido ceramida desempeña un papel importante en el daño inducido por estrés oxidativo, en el presente estudio nos planteamos estudiar la implicación de la ceramida en un modelo de apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno en astrocitos de rata. Así, utilizamos cultivos primarios de astrocitos a los que tras retirarles el suero durante 5 días se les añadió peróxido de hidrógeno.

Nuestros resultados muestran que: (i) el tratamiento con peróxido de hidrógeno induce apoptosis en las células mantenidas en medio sin suero pero no en los controles; (ii) los niveles de ceramida aumentan progresivamente hasta alcanzar un valor aproximadamente 2,5 veces mayor que el de los controles tras 5 días en medio sin suero; (iii) la incubación con cicloserina –un inhibidor de la serina palmitoil-transferasa (SPT), la enzima limitante de la síntesis *de novo* de ceramida– previene el efecto apoptótico del peróxido de hidrógeno en las células sin suero; (iv) la actividad de la SPT aumenta de forma paralela a los niveles de ceramida hasta alcanzar un valor de aproximadamente 2,5 veces el de los controles a día 5 de incubación; y (v) los niveles de la subunidad LCB1 de la SPT aumentan en paralelo a la actividad de la enzima.

En suma, nuestros datos indican que la generación de ceramida sintetizada *de novo* participa en la sensibilización de los astrocitos al estrés oxidativo tras la retirada de suero.

O 5

EXCITOTOXIC INSULTS TO OLIGODENDROCYTES CAUSE EARLY IRREVERSIBLE MITOCHONDRIAL DAMAGE

Ibarretxe G, Alberdi E, Sánchez-Gómez MV, Matute C

Departamento de Neurociencias, Universidad del País Vasco. Leioa, Vizcaya

Oligodendrocytes are vulnerable to excitotoxic signals mediated by AMPA receptors and by high and low affinity kainate receptors (KARs). Here we have investigated the nature of cell death triggered by activation of these receptors in primary cultures of oligodendrocytes from the rat optic nerve.

Selective activation of AMPA and kainate receptors induces a 2 to 8-fold increase in the basal $[Ca^{2+}]_i$ which is prevented by removal of Ca^{2+} from the medium and by the AMPA/kainate receptor antagonist CNQX. Microfluorimetry with the mitochondrial proton gradient uncoupler FCCP showed that within minutes after glutamate receptor activation $[Ca^{2+}]_i$ raises up to 50-fold and that the bulk of Ca^{2+} is rapidly sequestered into mitochondria. This leads to mitochondrial depolarisation and an increase in radical oxygen species which correlates with a decrease in reduced glutathione. Subsequently, we observed the release into the cytosol of the proapoptotic cytochrome c and activation of caspase-9 both of which occur within 30 min after receptor activation. Together, these results indicate that excitotoxic insults to oligodendrocytes cause early and profound irreversible mitochondrial dysfunction that determines the ensuing cell death.

Supported by Fundació La Caixa and the Ministerio de Sanidad y Consumo. G.I. holds a fellowship from the Gobierno Vasco, and E.A. is a Ramón y Cajal research fellow.

O 6

SISTEMA MODELO *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN DE AXONES DE SNC ADULTO PROMOVIDA POR CÉLULAS DE LA GLÍA ENVOLVENTE OLFATORIA

Pastrana E, Moreno-Flores MT, Wandosell F, Ávila J, Díaz-Nido J

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM),
Universidad Autónoma de Madrid

Las células de glía envolvente de bulbo olfatorio son un tipo especializado de glía, notable por su capacidad de estimular la regeneración axonal. Un medio de cultivo con un bajo contenido en suero permite mantenerlas de forma prolongada en cultivo preservando su identidad definida por marcadores como s100, 3PGDH, neroliguina, p75, GFAP etc. La capacidad de la glía envolvente de promover la regeneración de axones del SNC puede ser estudiada y medida en un sistema de cocultivo. Este abordaje nos ha permitido establecer diferencias en el efecto promotor de la regeneración de axones adultos

y jóvenes de neuronas ganglionares de retina (RGCs), así como en distintos tipos neuronales (RGCs frente a neuronas granulares de cerebelo), por parte de poblaciones distintas de glía envolvente, definidas por el número de pases que han sufrido en cultivo.

El estudio de factores que puedan influir la regeneración de axones adultos en este sistema *in vitro* nos permite determinar los mecanismos implicados en la capacidad que la glía envolvente tiene de regenerar axones del SNC de animales adultos.

O 7

REPARACIÓN DE LESIONES POR AVULSIÓN DEL PLEXO BRAQUIAL MEDIANTE EL TRASPLANTE DE GLÍA ENVOLVENTE EN RATAS

Muñetón-Gómez VC ^{a,b}, Averill S ^c, Robson L ^c, Collazos-Castro J ^d, Doncel-Pérez E ^a, Caballero-Chacón S ^a, Merino J ^a, Rodríguez-Rodríguez R ^a, Nieto-Sampedro M ^a, Priestley JV ^c, Taylor JS ^d

^a Instituto Cajal de Neurobiología, CSIC. Madrid, España.

^b Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia.

^c Queen Mary University of London, England. ^d Hospital de Paraplégicos de Toledo. Toledo, España

La rizotomía dorsal es un modelo apropiado para estudiar los factores que afectan la regeneración de los axones sensoriales, a través de la barrera entre el sistema nervioso periférico y central. Hemos efectuado una rizotomía dorsal del plexo braquial y estudiado la capacidad de los axones sensitivos, según el fenotipo, de volver a crecer hasta la zona de entrada de la raíz dorsal (DREZ) y el asta dorsal después de realizar trasplantes de glía envolvente (GE) Después de la rizotomía entre C4-T1 y trasplante de GE en el asta dorsal observamos restauración funcional de la modalidad térmica pero no mecánica (Taylor et al. Prog Brain Res 2001; 132: 651), aunque el mecanismo de este efecto permanecía incierto. Una posibilidad es que la GE promueve regeneración axonal mediante la disminución de la gliosis reactiva y en la expresión del proteoglicano inhibidor de membrana –IMPg– (Verdú et al. Neuroreport 2001; 12: 2303).

Las ratas se dividieron en los grupos: a) controles normales; b) rizotomizados C3-T3 (Riz); c) Riz y inyectados con medio DMEM; d) Riz y trasplantados con GE en DMEM. Examinamos los axones usando los anticuerpos contra las moléculas: receptor p75-NGF, CGRP, P2X3, IB4 y TCB. Western blot (WB) e inmunohistoquímica fueron usadas para evaluar la expresión del filamento intermedio GFAP y de los Pgs (3PE8, CS56 y NG2).

Nuestro estudio mostró que fibras positivas para P2X3 y CGRP crecieron hacia la DREZ y en algunos casos el trasplante promovió el crecimiento axonal en el asta dorsal (Muñetón-Gómez et al. Accepted J Neurocytol 2003). Los datos preliminares de WB indican que los trasplantes de GE disminuyen la expresión del IMPg y transforman el ambiente inhibitorio inducido por la deafferentación en un sustrato permisivo para el crecimiento de los axones.

O 8

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRASPLANTE AGUDO DE GLÍA ENVOLVENTE O DE CÉLULAS DE SCHWANN EN UNA LESIÓN MODERADA DE LA MÉDULA ESPINAL DE LA RATA

García-Alías G, López-Vales R, Forés J, Navarro X, Verdú E

Grupo de Neuroplasticidad y Regeneración. Instituto de Neurociencias.

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.

Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona

Se ha investigado la recuperación funcional y la neuroprotección promovida por el trasplante de glía envolvente del bulbo olfatorio (grupo GE) o de células de Schwann (grupo CS) en ratas sujetas a una lesión fotoquímica del segmento T8 de la médula espinal. 30 minutos después de la lesión, se inyectó una suspensión con 180.000 células de GE, de CS o del

vehículo (grupo DM). Durante 90 días, se valoró el control sensoriomotor de los animales, los potenciales motores y somatosensoriales evocados y los reflejos espinales (onda H). Inmunoquímica se valoró la reactividad glial (GFAP y proteoglicano), y la preservación de los tractos descendentes. Los resultados indican que a lo largo del seguimiento, la deambulación, la respuesta nociceptiva plantar, el control postural al plano inclinado y la amplitud de los potenciales somatosensoriales fue superior en los grupos GE y CS respecto al DM, mientras que la amplitud de los potenciales motores fue superior en el grupo GE respecto a los otros dos. La relación H/M fue menor en el grupo GE respecto a los otros. La inmunorreactividad de GFAP y proteoglicano fue inferior en el grupo GE respecto a CS y DM, preservándose más parénquima medular y tractos descendentes. Los resultados sugieren que los trasplantes de células gliales constituyen una terapia viable para reparar la médula lesionada, ofreciendo un mejor resultado el transplante de GE que de CS.

Desarrollo y plasticidad

Moderador: F. de Castro

O 9

EXPRESIÓN DE C-FOS Y CONDICIONAMIENTO CLÁSICO DE LA RESPUESTA PALPEBRAL EN CONEJOS

Jiménez-Díaz L^a, Sancho-Bielsa F^b, Palop J^b, Gruart A^a, López-García C^b, Delgado-García JM^a

^aDivisión de Neurociencias, L.A.B., Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

^bBiología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. Burjasot, Valencia

La inmunotinción con anticuerpos frente a la proteína C-Fos permite marcar las áreas corticales implicadas en la adquisición de una respuesta condicionada de parpadeo (Gruart et al. Neuroscience 2000; 100: 719). Un total de 10 conejos adultos se implantaron con electrodos bipolares para el registro del EMG del músculo orbicular de los párpados y para la estimulación de la rama supraorbitaria del nervio trigeminal. También se implantó una bobina metálica en el párpado para determinar su posición mediante la técnica del seguidor magnético. El estímulo condicionado (EC) y el incondicionado (EI) consistieron en sendos choques eléctricos de 1 y 10 ms de duración, a $1,5 \times 3 \times$ Umbral, respectivamente, separados entre sí 500 ms. Los animales se sacrificaron 1 h después de la 2a, 4a, 6a o 7a sesión de condicionamiento (la 7.ª sesión se realizó una semana después de finalizada la 6.ª) y los cerebros se procesaron para inmunotinción de C-Fos. Tras la 2.ª sesión, los animales mostraron un incremento significativo en la inmunoreactividad a C-Fos en el subículo y en las cortezas piriforme, entorrinal, perirrinal y parietal contralaterales al EI. Tras la 4.ª sesión, de condicionamiento, la inmunotinción de C-Fos disminuyó en todas las regiones, excepto en subículo, aunque siguió siendo significativamente mayor que en los animales pseudo-condicionados. Tras la 6.ª sesión, el marcaje contralateral disminuyó más aún, siendo no significativo para la corteza perirrinal y el subículo. Por último, tras la 7.ª sesión se detectó un aumento significativo en el número de células C-Fos-positivas en todas las regiones corticales contralaterales, excepto el subículo.

Financiado con ayudas de La Caixa, Junta de Andalucía (CVI-122) y DGICYT (BFI2002-00936).

O 10

GRADIENTE DE ADAPTACIÓN DE CUATRO SISTEMAS MOTORES DISTINTOS PARA LA REALIZACIÓN DE UNA MISMA TAREA MOTORA APRENDIDA

Gruart A^a, Streppel M^b, Guntinas-Lichius O^b, Angelov DN^c, Neiss EF^c, Delgado-García JM^a

^aDivisión de Neurociencias, L.A.B., Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.

^bKlinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde. Colonia, Alemania.

^cInstitut I für Anatomie der Universität zu Köln. Colonia, Alemania.

Se presenta un diseño para determinar la capacidad de grupos diferentes de motoneuronas de elaborar la misma respuesta palpebral aprendida, evocada mediante un paradigma de condicionamiento clásico del reflejo corneal. Se utilizaron ocho gatos divididos en cuatro grupos: control; con sección, rotación de 180° y resutura de la rama cigomática del nervio facial; con anastomosis bucocigomática del nervio facial, y con anastomosis hipoglosfacial. Los animales con la rama cigomática rotada realizaron idénticas respuestas aprendidas que el grupo control, aunque aquellas presentaron mayor amplitud, área y velocidad. Los animales con anastomosis bucocigomática también realizaron respuestas aprendidas, pero fueron de muy pequeña amplitud y desincronizadas. Los animales con anastomosis hipoglosfacial no produjeron respuestas palpebrales aprendidas. La hiperreflexia de origen trigeminal registrada en los animales operados contribuyó a la generación de respuestas aprendidas de mayor amplitud tras la rotación del nervio cigomático, y de pequeño tamaño en los animales con anastomosis bucocigomática, pero no alcanzó el umbral de las motoneuronas para realizar respuestas aprendidas en animales con anastomosis hipoglosfacial. Existe pues un gradiente de adaptación de distintos grupos neuronales sometidos a la elaboración de nuevas tareas motoras a través de otros músculos, que depende de su origen embriológico y de su función en el animal adulto.

Financiado por JA/CVI122 y BFI200200936.

O 11

CaM KINASA IV PROMUEVE LA SUPERVIVENCIA DE MOTONEURONAS ESPINALES DE POLLO: MECANISMOS IMPLICADOS

De Pablo Y, Pérez-García MJ, Soler R, Comella JX, Llovera M

Grup de Neurobiologia Molecular. Dept. Ciències Mèdiques Bàsiques.

Universitat de Lleida

Los factores neurotróficos y la actividad bioeléctrica son esenciales para la supervivencia de las neuronas. Ambas señales producen un aumento del nivel de Ca^{2+} intracelular, el cual actúa como segundo mensajero. La calmodulina, como sensor de Ca^{2+} intracelular sufre un cambio conformacional y activa una serie de proteínas, entre las que se encuentra la familia de las kinasas dependientes de calcio-calmodulina (CaMKs). Nuestro grupo se ha interesado en estudiar el papel de las CaMKs sobre la supervivencia de las motoneuronas espinales de embrión de pollo (MTNs). Hemos visto que la transfección de una CaMKIV constitutivamente activa (CaMKIVca) es capaz de rescatar las MTNs de la muerte provocada por la retirada de factores tróficos; sin embargo, otros miembros de esta familia, CaMKK, CaMKI y CaMKII, no han mostrado ningún efecto sobre la supervivencia en las mismas condiciones. Si bien se ha descrito que la vía PI 3-kinasa/AKT está implicada en la supervivencia inducida por factores neurotróficos, no está claro el papel de esta vía en la supervivencia por despolarización. A fin de analizar la implicación de la vía PI 3-kinasa/AKT en la supervivencia inducida por CaMKIV, estamos estudiando si esta supervivencia es bloqueada por el inhibidor de PI 3-kinasa LY294002, y paralelamente, si la sobreexpresión de CaMKIVca provoca la fosforilación y activación de AKT en células PC12.

Financiado por FIS (MSC), Fundació La Caixa y Generalitat de Catalunya. Y. de Pablo es becaria MCYT.

O 12**UTILIZACIÓN DEL ACETATO COMO PRECURSOR LIPOGÉNICO Y OXIDATIVO POR NEURONAS Y ASTROCITOS DURANTE LA PRELACTANCIA**

Tovar JA, Guzmán E, Albarraán SL, Barrios L, Salazar A
*Grupo de Neurobioquímica. Departamento de Nutrición y Bioquímica.
 Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia*

El acetato ha sido uno de los sustratos menos estudiados durante la prelactancia, a pesar de existir evidencia suficiente para ser un candidato como sustrato energético y lipogénico para el desarrollo del cerebro. El trabajo con acetato (5 mM), [U-¹⁴C], [1-¹⁴C] y [2-¹⁴C]-acetato (1 µCi) nos ha revelado que las neuronas y los astrocitos (de ratas Wistar) en cultivo primario son capaces de utilizar este sustrato como precursor oxidativo y lipogénico, demostrando actividad de la acetilCoA sintetasa (EC 6.2.1.1) en sus isoformas citosólica y mitocondrial. Adicionalmente, al utilizar el inhibidor α-ciano-4-hidroxycinnamato se ha encontrado una diferencia en la captación de este sustrato a nivel mitocondrial, siendo más sensibles los astrocitos al aumentar la lipogénesis y disminuir la respiración ($p < 0,05$). Por otro lado, al utilizar los inhibidores aminooxacetato y butilmalonato se estableció que el oxalacetato es el sustrato limitante para el metabolismo del acetato en los astrocitos, pero no en las neuronas. Los resultados con dicloroacetato han demostrado una función anaplerótica significativa tanto en neuronas como en astrocitos. Por último el trabajo desarrollado con el 1,2,3-bencenotricarboxilato ha revelado que la respiración como la lipogénesis se ven más disminuidas en los astrocitos que en las neuronas ($p < 0,05$). Los resultados en su conjunto revelan que el acetato puede ayudar a mantener la homeostasis energética y la lipogénesis intracelular durante la prelactancia.

O 13**EXPRESIÓN DEL GEN DE CALCITONINA EN EL ENCÉFALO DE RATA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS**

Canudas J, Sorribas V, Sarasa M
Laboratorio de Neurobiología. Universidad de Zaragoza

La calcitonina es un péptido de 32 aminoácidos mayoritariamente producido por las células C del tiroides, cuya función conocida es la regulación de la homeostasis del calcio, actuando sobre los osteoclastos y células renales. También se detecta calcitonina durante la embriogénesis del pollo en la placa del suelo del tubo neural, en el rombencéfalo y en la placoda ótica. Dado que el embrión de pollo es un sistema metabólicamente aislado, hemos estudiado si mamíferos como la rata también expresan calcitonina antes de la aparición de las células C del tiroides. Hemos analizado el periodo embrionario comprendido entre los días 12 y 19. Para ello se utilizó inicialmente la técnica de RT-PCR, con la cual se confirmó la presencia de RNA mensajero de calcitonina. Posteriormente se detectó dicho RNA de forma directa y cuantitativa mediante RPA (*ribonuclease protection assay*). La determinación espacial de la expresión génica de calcitonina se ha hecho mediante hibridación *in situ*, detectando su presencia en la región dorsal del diencéfalo de embriones de 13 a 17 días. Estos resultados inducen a pensar que la calcitonina está desempeñando algún papel fisiológico en el desarrollo del encéfalo.

O 14**POLARIZACIÓN DE LOS CAMBIOS DE CALCIO ASOCIADOS A NUCLEOQUINESIS EN NEURONAS QUE MIGRAN TANGENCIALMENTE**

Moya F, Valdeolmillos M
Instituto de Neurociencias-CSIC, Universidad Miguel Hernandez. Alicante

Las interneuronas corticales se originan en las eminencias ganglionares (EG) y alcanzan su territorio final usando rutas migratorias tangenciales.

Hemos analizado mediante microscopía confocal en tiempo real, el movimiento de células migrando tangencialmente en la zona intermedia de rodajas coronales de embriones. Las células que migran tangencialmente lo hacen mediante nucleokinesis, caracterizada por fases activas de movimiento nuclear en el interior del proceso guía, seguidos por periodos de quiescencia. La fase activa de nucleokinesis se asoció con aumentos de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$); sin embargo, la localización precisa de los mismos es difícil de analizar en las rodajas. Para ello se estudiaron los cambios de $[Ca^{2+}]_i$ en cultivos de células disociadas de la EG. Las células mostraron movimientos nucleokíneticos similares a los observados en las rodajas. La fase activa de la nucleokinesis se asoció a un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ localizado en la región proximal del proceso guía, una zona en la que la G-tubulina se acumula preferentemente, indicando la orientación menos-más de los microtúbulos en el proceso guía. La polarización de los cambios de calcio es una característica esencial del proceso, ya que cambios globales de $[Ca^{2+}]_i$ no fueron capaces de producir nucleokinesis. Estos resultados indican que las migraciones tangenciales usan nucleokinesis como modo de movimiento, un proceso autónomo celular en el que la señalización por calcio es local, direccional y está estrechamente regulada.

Financiación: DGEIC PM98-0099 (F.M.) y SAF2000-0152-C02-02/FIS-PI020314 (MV).

O 15**RESPUESTA DIFERENCIAL DE CÉLULAS MADRE NEURALES (NSCs) ADULTAS Y EMBRIONARIAS, COMO RESPUESTA A LA SOBREEXPRESIÓN DE P53 INDUCIDA POR DAÑO EN EL DNA**

Ferrón S^a, Ramírez-Castillejo C^a, Franco S^b, Mira H^c, Blasco M^b, Fariñas I^a

^aUnidad de Neurobiología Molecular, Dpto. de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. ^bDpto. Inmunología y Oncología, CNB (CSIC), Madrid. ^cLaboratorio de Neurobiología Molecular, Dpto. Bioquímica y biofísica médica. Instituto Karolinska. Estocolmo, Suecia

Como se ha sugerido en estudios de células madre hematopoyéticas, un candidato a reloj interno en NSCs es el cambio en la longitud de los telómeros. NSCs aisladas de eminencias ganglionares de E15 muestran una mayor tasa de crecimiento que las aisladas de la zona subventricular del adulto. Para determinar si estas diferencias de comportamiento pudieran estar reguladas intrínsecamente, hemos analizado la longitud telomérica de poblaciones adultas y embrionarias a lo largo del tiempo en cultivo. La actividad de la enzima telomerasa disminuye significativamente en cultivo. Dicha inactividad lleva a la pérdida telomérica, lo que se manifiesta en la aparición de múltiples aberraciones cromosómicas. En respuesta a este daño, se observa un aumento en la concentración de P53. Para mimetizar el efecto del aumento de esta proteína clave en el ciclo celular, se han desarrollado tratamientos con adriamicina, que provoca roturas de doble cadena en el DNA. Dicho tratamiento provoca una parada en G2 en NSCs adultas, exhibiendo además una reducción en la tasa de incorporación de BrdU, sin mostrar características de apoptosis. Dicho efecto no se observa en NSCs embrionarias, que no responden con parada del ciclo al daño en su DNA. Los resultados indican la presencia en las células embrionarias de mecanismos específicos que permiten saltarse la parada del ciclo y que desaparecerían en las células adultas. Profundizar en dichos mecanismos ayudará en la futura aplicación de las NSCs en terapias de reparación.

O 81

LOS RATONES MUTANTES PARA LOS GENES REGULADORES MSX1 O PAX6 CARECEN DE ÓRGANO SUBCOMISURAL (OSC) Y COMISURA POSTERIOR (CP) Y DESARROLLAN HIDROCEFALIA

Fernández-Llebrez P^a, Bach A^d, Estivill-Torrús G^b, Lallemand Y^d, López-Aranda M^a, Ramos C^c, Grondona JM^a, Pérez J^a, Llebrez-Zayas PF^b, Robert B^d

^aDep. Biología Celular, Genética y Fisiología, Fac. Ciencias, Univ. Málaga.

^bFundación de Investigación, Hospital Carlos Haya, Málaga. ^cDep. Biología Celular, Univ. Central de Barcelona. ^dUnité de Génétique Moléculaire de la

Morphogenèse, Institute Pasteur, París

Msx1 es un gen regulador implicado en interacciones epitelio-mesénquima. En el SNC embrionario, se expresa en la línea media dorsal. En adultos, su expresión se mantiene en zonas del epitelio endodermio, como el OSC. El gen Pax6 se expresa en la región dorsal del prosencéfalo y diencéfalo embrionario y en el OSC. Pax6 interviene en la regulación de la proliferación de precursores. La expresión de estos genes es esencial para el desarrollo de los derivados del prosómero 1 OSC y CP. Los ratones mutantes para Pax6, o para Msx1 carecían de OSC y CP. Los heterocigotos presentaban alteraciones o reducción del OSC. Algunos mutantes Msx1 si desarrollaron OSC y CP presumiblemente debido a un fenómeno de redundancia funcional entre Msx1 y Msx2. Sin embargo, este OSC no sintetizaba glicoproteínas identificables mediante inmunocitoquímica. Los mutantes para Pax6 o Msx1, incluso aquellos individuos que poseían OSC, desarrollaron una hidrocefalia obstructiva debido al colapso del acueducto de Silvio. Las conclusiones de este estudio son: 1) Los genes Msx1 y Pax6 son esenciales para el desarrollo de los derivados del prosómero 1, OSC y PC. 2) En ausencia de Msx1, Msx2 puede compensar parcialmente. 3) Msx1 es imprescindible para la actividad secretora del OSC. 4) El desarrollo de OSC y PC está ligado, ambas estructuras están presentes o ausentes pero nunca una sin la otra. 5) La presencia de un OSC funcional, es decir, formador de glicoproteínas específicas, es necesaria para el correcto desarrollo del acueducto de Silvio. 6) la ausencia del OSC, o de sus glicoproteínas, y el colapso del acueducto provocan hidrocefalia. Financiación: DGICYT (BF12000-1360), FIS (01/0948), FIS (PIO21517), Red CIEN (ISC III).

Enfermedad de Parkinson

Moderadores: J. Serratos y J.L. Labandeira

O 16

EL TRASPLANTE INTRAESTRIATAL DE CÉLULAS CROMAFINES DEL PARAGANGLIO DE ZUCKERKANDL EJERCE UNA ACCIÓN TRÓFICA QUE INDUCE UNA MEJORA FUNCIONAL MOTORA Y MOTIVACIONAL EN RATAS PARKINSONIANAS

El Banoua F, Flores JA, Galán B, Caraballo I, Fernández-Espejo E
Departamento de Fisiología Médica. Universidad de Sevilla

El trasplante intraestriatal de células cromafines del paraganglio de Zuckerkandl induce una mejoría gradual de déficits funcionales en ratas parkinsonianas. Los objetivos fueron: 1) caracterizar la morfología funcional de dicho paraganglio, 2) analizar los efectos funcionales del trasplante en déficits motivacionales (acinesia y ansiedad), y 3) confirmar la supervivencia a largo plazo de células trasplantadas (el paraganglio se inyectó con fluorogold una semana antes del trasplante). El parkinsonismo se indujo en las ratas por medio de 6-hidroxi-dopamina. Los resultados mostraron que el paraganglio se compone de mesénquima y células cromafines (22% del órgano) que se distribuyen en cordones longitudinales con el aspecto de «nidos» celulares al corte coronal. Estas células se tiñen con dicromato potásico y expresan cromogranina A, tirosina-hidroxi-lasa (TH) y dopamina-

beta-hidroxi-lasa (DBH). La feniletanolamina-N-metil-transferasa (PNMT) no se expresa, indicando que las células son noradrenérgicas. Las células son activas in vivo pues expresan c-Fos. Tras el trasplante, las asimetrías motoras disminuyeron gradualmente (1 mes, $p < 0,05$; 3 meses, $p < 0,01$), y el grado de ansiedad (elevado en ratas parkinsonianas sin trasplante) se redujo significativamente. Sin embargo, la acinesia no mejoró. Los datos histológicos mostraron células fluorescentes en trasplantes de 3 meses, además de una neta reinervación dopaminérgica estriatal. Las células trasplantadas expresaban y liberaban GDNF y TGF- β 1, factores tróficos que protegen las células dopaminérgicas de la neurodegeneración, lo que explicaría la reinervación estriatal y mejoría funcional.

Financiado a EFE por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Andaluz de Investigación, y Laboratorios Dr. Esteve (Barcelona).

O 17

LOS ANTAGONISTAS CANNABINOIDES DEL RECEPTOR CB1 EJERCEN EFECTOS ANTIPARKINSONIANOS ÚNICAMENTE EN RATAS CON LESIÓN GRAVE DE LA SUSTANCIA NEGRA

Fernández-Espejo E, Caraballo I, El Banoua F, Flores JA, Galán B
Departamento de Fisiología Médica. Universidad de Sevilla

La modulación del sistema endocannabinoide endógeno podría ser de utilidad para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En nuestro laboratorio se ha observado que la administración sistémica de antagonistas cannabinoides del receptor CB1 (SR141716A y AM251) ejerce efectos antiparkinsonianos (en un rango de dosis) en ratas con grave lesión nigrica (>94% pérdida de células TH+, conteo celular TH), pero no con lesión más moderada (85-94% pérdida neuronal). Con el fin de identificar los centros nerviosos de acción, se realizaron inyecciones locales en distintos ganglios basales. Las infusiones en el estriado dorsal denervado y en el correspondiente globo pálido redujeron los déficits motores de un modo dependiente de dosis ($p < 0,05$). Los efectos estriatales estaban mediados por una modulación opuesta de los receptores D1 (son estimulados) y D2 (son inhibidos) de dopamina. Los receptores D1 y D2 palidales no participaban en el efecto motor de los cannabinoides. Por otra parte, las infusiones en la sustancia negra agravaron los déficits motores, excepto en ratas con lesión grave. Los resultados sugieren que: 1) la administración sistémica de antagonistas CB1 en ratas con lesión nigrica moderada es inefectiva porque el efecto motor mediado por neuronas estriatales y palidales es antagonizado por la acción nigrica, y 2) ejercen acción antiparkinsoniana cuando la degeneración es grave porque el efecto opuesto de la sustancia negra desaparece. Los antagonistas CB1 no poseen efectos psicoactivos, y podrían ser de valor terapéutico en estadios avanzados de la enfermedad de Parkinson. Financiado a EFE por Plan Nacional sobre drogas, Plan Andaluz de Investigación, y Laboratorios Dr. Esteve (Barcelona).

O 18

COMPUESTOS TIÓLICOS Y SISTEMA DOPAMINÉRGICO: NEUROPROTECCIÓN O NEUROTOXICIDAD

Muñoz A, López-Real A, Rey P, Quiroz C, Labandeira-García JL
Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidad de Santiago de Compostela

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que compuestos tiólicos como la N-acetil-cisteína (NAC) y cisteína (CySH) poseen propiedades neuroprotectoras frente a toxinas dopaminérgicas (DA). Se ha sugerido su posible aplicación en la enfermedad de Parkinson (EP). Sin embargo, estos compuestos podrían presentar otros efectos que complican su utilización in vivo. En este trabajo hemos realizado inyecciones intraestriatales de NAC, CySH o ascorbato, junto con la neurotoxina DA 6-OHDA para estudiar los efectos de estos compuestos tiólicos tanto sobre la degeneración de las terminales DA como sobre las células estriatales. Los animales se sacrificaron 36 horas o 3 semanas después de la lesión y se realizó inmunomarcado para tirosina hidroxi-lasa (TH), NeuN (marcador neuronal), hemoxigenasa (HO-1) y GFAP, OX-42 y OX-6 (marcadores gliales). Los estriados inyectados

con NAC o CySH mostraban una gran reducción del área de denervación DA inducida por la 6-OHDA. Sin embargo, los cambios observados en las células estriales sugieren un efecto excitotóxico. Se observó una zona central de depleción neuronal inmunonegativa para NeuN, con células redondas positivas para OX-6, OX-42 y HO-1, rodeada de un anillo de células inmunopositivas para HO-1 y/o GFAP. Nuestros resultados indican que los compuestos tiólicos son potentes neuroprotectores dopaminérgicos, pero pueden producir excitotoxicidad sobre las neuronas estriales. Por lo tanto, este efecto excitotóxico debe ser neutralizado antes de plantearse el uso de estos compuestos en una terapia neuroprotectora para la EP.

Trabajo financiado por XUGA y DGSEIC (PGC).

O 19

LA ELIMINACIÓN DE CÉLULAS SEROTONINÉRGICAS INDUCE UN AUMENTO EN LA GENERACIÓN DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS OBTENIDAS A PARTIR DE NEUROSFERAS

Rodríguez-Pallares J, Parga J, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-García JL

Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidad de Santiago de Compostela

Son pocos los datos de los que se dispone sobre las señales que median la producción de neuronas dopaminérgicas (DA) y de la influencia de otras poblaciones celulares que se generan simultáneamente a partir de neurosféricas. En este trabajo se estudió si células DA (inmunorreactivas para tirosina hidroxilasa, TH-ir), serotoninérgicas (5-HT-ir), de la placa basal (FP4-ir), o FGF-8-ir se diferencian a partir de neurosféricas de células progenitoras mesencefálicas. Además, se estudió la influencia de la población de células 5-HT-ir sobre la diferenciación de células DA derivadas de estas neurosféricas. Nuestros resultados evidenciaron la presencia de células FP4-ir, FGF-8-ir, TH-ir y 5-HT-ir en las neurosféricas. Las células TH-ir aparecieron dentro o en las proximidades de la zona central de la neurosfera FP4-ir, y tendieron posteriormente a localizarse en zonas periféricas formando una capa que bordeaba la zona FP4-ir. Las células y fibras 5-HT-ir se dispusieron formando una capa en torno a las neuronas TH-ir. Por otra parte, las neurosféricas sembradas en presencia de un anticuerpo anti-FGF-4, o de la toxina serotoninérgica 5,7-dihidroxitriptamina, o del inhibidor de la síntesis de serotonina DL-p-clorofenilalanina (pCPA) mostraron una disminución acentuada del número de células 5-HT-ir (10-20% de los controles no tratados) y un aumento significativo del número de células TH-ir (700-900% del control). Estos resultados muestran que la manipulación de otras poblaciones celulares en las neurosféricas y especialmente de la población serotoninérgica puede representar un método efectivo para aumentar la producción de neuronas DA para su utilización en trasplantes.

Trabajo financiado por XUGA y DGSEIC (PGC).

O 20

TRANSPORTADORES DE DOPAMINA Y VULNERABILIDAD DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MESENCÉFÁLICAS

González-Hernández T^a, Barroso-Chinea P^c, Pérez-Delgado MM^a, Rodríguez M^b

^aDpto de Anatomía, Universidad de La Laguna. ^bDpto de Fisiología,

Universidad de La Laguna. ^cUnidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias. Tenerife

El catabolismo de la dopamina (DA) es una fuente importante de productos de oxidación, por lo que los niveles altos de DA en el citosol son considerados un factor predisponente de degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson (EP). Los niveles de DA citosólica dependen fundamentalmente de su síntesis, cuya enzima limitante es la tirosina hidroxilasa (TH), y de dos transportadores, uno de membrana (DAT) que recapta la DA desde el espacio extracelular y otro vesicular (VMAT2) que introduce la DA en las vesículas sinápticas desde el citosol, impidiendo que sea metabolizada. Nosotros hemos

investigado la relación entre la expresión (RNAm y proteína) de ambos transportadores y la vulnerabilidad diferencial de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, utilizando hibridación *in situ*, inmunofluorescencia, técnicas de cuantificación y un modelo de EP en rata que reproduce el patrón topográfico de degeneración de la EP. Los hallazgos muestran que: 1) los niveles de expresión de RNAm de TH, DAT y VMAT2 siguen patrones paralelos aunque con diferencias entre unos grupos celulares y otros, 2) para DAT no existe correlación entre niveles de mensajero y de proteína, lo que sugiere diferencias internucleares en la regulación post-transcripcional de este transportador, y 3) la vulnerabilidad diferencial de las neuronas dopaminérgicas está estrechamente relacionada con el índice proteico DAT/VMAT2, no con los niveles de sus mensajeros o proteínas considerados aisladamente.

O 21

ACTIVACIÓN MICROGLIAL EN LA SUSTANCIA NEGRA PARS COMPACTA DE MONOS PARKINSONIANOS UN AÑO DESPUÉS DE LA ÚLTIMA DOSIS DE MPTP

Barcia C, Bautista V, Sánchez-Bahillo A, Fernández-Villalba E, Herrero MT

Neurología y Neurocirugía Experimental. Facultad de Medicina.

Universidad de Murcia

Una de las hipótesis para explicar la perpetuación de la muerte neuronal dopaminérgica es la activación de procesos inflamatorios mediados por células microgliales. Estas células pueden liberar al parénquima diferentes productos inflamatorios que facilitarían la activación de estos fenómenos. En el presente estudio se utilizaron 6 monos adultos, tres de ellos se trataron durante 2,5 años con dosis sistémicas de MPTP (0,3 mg/kg) y los 3 restantes se utilizaron como control. Los animales no fueron tratados con levodopa ni con agonistas dopaminérgicos y se sacrificaron un año después de la última dosis. Series de secciones de mesencéfalo fueron inmunotecnadas para TH, GFAP y HLA-DR. Se observó una dramática pérdida neuronal dopaminérgica (neuronas TH⁺), un aumento de astrocitos (células GFAP⁺) y gran activación microglial en la sustancia negra pars compacta caracterizada por gran expresión de HLA-DR. Las células microgliales mostraban una morfología activada, con el cuerpo celular de mayor tamaño y con prolongaciones más cortas. Estas células aparecieron además frecuentemente alrededor de cuerpos neuronales. Los resultados indican que la reacción microglial puede perpetuarse un año después de la exposición a la noxa y que podría ser causa de inducción y/o perpetuación del proceso neurodegenerativo lo que sugiere que el uso de antiinflamatorios podría ser beneficioso para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Financiado por F.Séneca (PI388760) y MCYT (SAF2001-479).

O 23

RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN G6PD EN LAS NEURONAS NIGROESTRIALES: CARACTERÍSTICAS GENERALES Y RESISTENCIA A LA TOXICIDAD PRODUCIDA POR EL MPTP

Mejías R^a, Villadiego J^a, Pintado OC^b, Vime P^a, Toledo-Aral J^a, Echevarría M^a, López-Barneo J^a

^aLaboratorio de Investigaciones Biomédicas, Hospital Universitario Virgen del

Rocío. ^bCentro de Producción y Experimentación Animal, Universidad de Sevilla. Sevilla, España

Entre los factores patogénicos de la enfermedad de Parkinson (EP) está el estrés oxidativo inherente al metabolismo de la dopamina. Para determinar si la protección frente a la oxidación protege las neuronas nigroestriales de la neurodegeneración se ha generado un ratón transgénico (TG) específico de tejido que sobreexpresa la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), enzima limitante en la síntesis de NADPH esencial para la producción de glutatión. La expresión del transgén se dirigió a la sustancia negra usando un promotor de 9 kb del gen de la tirosina hidroxilasa (TH) de rata.

El patrón de expresión de la G6PD se analizó mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Se observó expresión fundamentalmente en neuronas ventrales mesencefálicas y en menor medida en hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, *locus ceruleus*, amígdala y corteza. La actividad enzimática de la G6PD se encontró aumentada en la sustancia negra y el estriado. Se ha estudiado si la sobreexpresión de G6PD disminuye la acción tóxica de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Se inyectó subcutáneamente MPTP (40 mg/kg) a grupos de 5-7 TG y 5-7 hermanos de TG no positivos. Los animales se sacrificaron siete días después de la inyección para examinar la vía nigroestriatal. Los animales TG fueron menos afectados por la inyección de MPTP. Estos animales conservaron mayor número de células TH positivas y densidad de innervación dopaminérgica del estriado. Estos datos sugieren que las alteraciones metabólicas podrían predisponer a la EP y que una posible aproximación terapéutica sería la estimulación de la producción de NADPH.

Sistemas sensoriales: visual

Moderadores: L. Martínez y M.V. Sánchez

O 24

NEUROMODULACIÓN DE LA APARICIÓN DE RESPUESTAS EN RÁFAGAS EN EL TÁLAMO VISUAL

Martínez L^a, Rivadulla C^a, Grieve K^b, De Labra C^a, Cudeiro J^a

^aNEUROcom (Neurociencia y Control Motor), Departamento de Medicina,

Universidad de A Coruña. ^bDept. Optometry and Neuroscience, UMIST.

Manchester, UK

El disparo en ráfagas en las células talámicas se asocia, habitualmente, con el sueño. Sin embargo, se ha demostrado que las ráfagas existen en los animales despiertos y pueden estar relacionadas con la transmisión de información sensorial. Este tipo de actividad se debe a una hiperpolarización de la membrana celular relacionada con corrientes iónicas específicas, y que, por tanto, podrían estar controladas por los diferentes sistemas moduladores que actúan en el tálamo. En este estudio nos planteamos investigar, en el gato anestesiado, los mecanismos que inducen a una célula a disparar ráfagas de potenciales de acción y si esta actividad aparece de forma abrupta al alcanzar un umbral o se instaura de forma progresiva. Nuestros datos indican que: 1) el porcentaje de ráfagas aumenta con la eyección de fármacos que hiperpolarizan la célula (agonistas gabérgicos A y B, antagonistas colinérgicos); 2) el aumento en el porcentaje de ráfagas se produce de manera repentina; 3) el número de ráfagas no se relaciona con la tasa de descarga de la célula: la eyección de L-NitroArg, que bloquea la síntesis de NO, reduce la respuesta de las células pero no modifica el porcentaje de ráfagas. Estos resultados apoyan la presencia de dos estados funcionales (tónico/ráfaga), bajo el control de los mecanismos neuromoduladores del tálamo y sugieren que las ráfagas podrían intervenir en el procesamiento visual.

Financiado por MCYT-BFI2002-03200. C. De Labra es becaria posdoctoral del MEC.

O 25

DISTRIBUCIÓN DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN TÓNICOS Y EN RÁFAGAS EN EL CAMPO RECEPTOR DE LAS CÉLULAS TALÁMICAS

Rivadulla C^a, Martínez L^a, Grieve K^b, De Labra C^a, Cudeiro J^a

^aNEUROcom (Neurociencia y Control Motor), Departamento de Medicina,

Universidad de A Coruña. ^bDept. Optometry and Neuroscience, UMIST.

Manchester, UK

Se ha sugerido que los diferentes modos de respuesta de las células talámicas proporcionan al sistema visual diferentes ventajas a la hora de analizar la información que desde el tálamo viaja a la corteza. Los

potenciales de acción en modo tónico contribuirían a una transferencia lineal optimizando el análisis de la señal, mientras que las ráfagas contribuirían a la detección de nuevos estímulos. Sin embargo, ignoramos cómo es la distribución espacial dentro del campo receptor (CR) de la célula talámica, de cada tipo de modalidad funcional. Para ello, en el gato anestesiado, hemos comparado los CR obtenidos con la técnica de *sparse noise* para los potenciales de acción individuales (tónicos) con los obtenidos utilizando únicamente los pertenecientes a las ráfagas. Estos últimos tienden a concentrarse en la zona central del CR, lo que se traduce en una disminución de su tamaño cuando se contabilizan sólo los potenciales de acción en esta modalidad. Mediante la manipulación farmacológica demostramos que la disminución es mayor al aumentar el porcentaje de potenciales de acción en ráfagas. Esta restricción en el tamaño del CR sugiere que esta forma de disparo es un mecanismo ideal para localizar de manera rápida y precisa en el espacio un nuevo estímulo visual y activar los mecanismos que dirigen nuestra atención a esa zona. Financiado por MCYT-BFI2002-03200. C. De Labra es becaria posdoctoral del MEC.

O 26

INERVACIÓN CATECOLAMINÉRGICA DE LAS CÉLULAS PIRAMIDALES EN LA CORTEZA TEMPORAL HUMANA

Benavides-Piccione R, Arellano J, DeFelipe J

Instituto Cajal (CSIC). Madrid

En la neocorteza humana, las fibras que contienen tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, se encuentran presentes en todas las capas corticales, aunque predominan en capas I, V, y VI. En este estudio hemos cuantificado la innervación catecolaminérgica de células piramidales localizadas en las capas II, IIIa V y VI de la corteza temporal humana. Hemos realizado inyecciones intracelulares de Lucifer Yellow en tejido fijado y, con posterioridad, lo hemos procesado inmunocitoquímicamente con TH, con el fin de visualizar las fibras catecolaminérgicas. Encontramos que todas las células piramidales, analizadas con el microscopio confocal recibían innervación catecolaminérgica, tanto en las dendritas basales como apicales. Además, observamos que el número de contactos TH positivos (TH-ir) con las dendritas apicales y basales es muy similar para cada una de las capas corticales. Por otra parte, la densidad de contactos TH-ir entre capas es también similar y sólo encontramos una disminución significativa en las dendritas basales de capa IIIa. Finalmente, la distribución de los contactos TH-ir a lo largo del árbol dendrítico apical y basal es muy parecida en todas las células piramidales analizadas. Estos resultados sugieren que las células piramidales parecen recibir un número óptimo de contactos catecolaminérgicos y que esta innervación se encuentra estereotípicamente organizada en la corteza cerebral humana.

O 27

IMPACTO DE LA ACTIVIDAD RÍTMICA CORTICAL EN LA DEPRESIÓN SINÁPTICA A CORTO PLAZO

Reig R, Gallego R, Sánchez-Vives MV

Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC.

San Juan de Alicante

La estimulación repetida de conexiones intracorticales a menudo induce una disminución del tamaño de los potenciales sinápticos conocida como depresión a corto plazo, propiedad de crucial importancia para las propiedades computacionales de la red cortical. La mayor parte de los datos de la literatura referentes a la depresión sináptica a corto plazo se han obtenido *in vitro* en rodajas silentes. Nosotros hemos desarrollado una preparación de rodajas de corteza cerebral *in vitro* que genera actividad espontánea en forma de oscilaciones lentas (<1 Hz) similares a las del sueño de ondas lentas (Sánchez-Vives MV et al. Nat Neurosci 2000; 3: 1027). En estas condiciones hemos estudiado la depresión sináptica a

corto plazo, estimulando en capa 4 y registrando la actividad intra y extracelularmente en capa 2/3 en la corteza visual del hurón. Nuestros resultados muestran que en una red cortical activa existe una depresión sináptica significativamente menor que en una red cortical silente. El grado de depresión disminuye paralelamente a la actividad de la red y en función de la duración e intensidad de dicha actividad. Después de 20-60 min de actividad sináptica el nivel de depresión alcanza un mínimo que se estabiliza. Nuestros resultados sugieren que en una red neuronal activa, el estado estacionario de las sinapsis es distinto y más cercano a la situación *in vivo*, como corroboran nuestros estudios en el animal entero.

Financiado por HFSP RGP0025/2002-C y MCYT BFI2002-03643

O 28

OSCILACIONES RÁPIDAS DURANTE ESTADOS ACTIVADOS DE LA RED CORTICAL *IN VITRO*

Compte A, Puccini G, Harvey M, Descalzo VF, Reig R, Sánchez-Vives MV

Instituto de Neurociencias, Univ. Miguel Hernández-CSIC.
Sant Joan d'Alacant

La actividad rítmica rápida y sincrónica de colectividades neuronales se relaciona con procesos cognitivos como atención, aprendizaje y percepción; pero sus mecanismos de generación y organización aún son desconocidos. Aquí demostramos que los microcircuitos corticales generan actividad oscilatoria rápida en corteza visual de hurón *in vitro*. Inducimos oscilaciones lentas (<1 Hz), similares a las observadas durante sueño de onda lenta, modulando las concentraciones iónicas extracelulares (Sánchez-Vives MV et al. Nat Neurosci 2000; 3: 1027). Estas oscilaciones consisten en episodios de actividad (<1 s, *up states*) separados por periodos de relativo silencio (2-5 s, *down states*). Hemos aplicado técnicas espectrales a datos de registros extra e intracelulares en nuestra preparación *in vitro*. Los resultados para registros extracelulares revelan picos espectrales en frecuencias del rango beta a gama (~15 a 40 Hz), que son coherentes temporalmente con los *up states*. Esto sugiere que durante los periodos de activación de la red (*up states*), similares a la actividad cortical durante la vigilia, las colectividades corticales se sincronizan generando un ritmo intrínseco de la red. Discutimos este efecto también en relación a la estructura temporal de trenes de espigas neuronales y trenes de entradas sinápticas registrados independientemente.

Financiado por HFSP RGP0025/2002-C y MCYT BFI2002-03643 a MVS y MCYT BFI2002-02378 a AC.

O 29

CODIFICACIÓN DEL MOVIMIENTO EN POBLACIONES DE CELULAS GANGLIONARES RETINIANAS REGISTRADAS SIMULTÁNEAMENTE

Bonomini P, Bongard M, Ferrández JM, Fernández E

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández. Sant Joan d'Alacant

El estudio del procesamiento de la información en diferentes sistemas neurales esta adquiriendo una importante relevancia para el diseño y desarrollo de neuroprótesis, como las prótesis auditivas o los implantes retinianos. Para una amplia utilización médica de esta tecnología, es necesario entender como las señales eléctricas procedentes de estos microsistemas electrónicos deben codificar la información para que esta pueda ser correctamente procesada por el sistema nervioso. En este trabajo hemos utilizado una matriz de 100 microelectrodos para registrar simultáneamente poblaciones de células ganglionares en retinas de tortuga, conejo y rata. Diferentes poblaciones de células ganglionares fueron estimuladas con luz de diferente intensidad y longitud de onda, así como con diferentes patrones espacio-temporales con el fin de recoger la mayor cantidad de información posible acerca de las propiedades fisiológicas de las células registradas. Los registros extracelulares obtenidos fueron almacenados en soporte magnético y analizados

posteriormente utilizando técnicas clásicas, teoría de la información y redes neurales. Nuestros resultados muestran que el análisis de poblaciones celulares proporciona una valiosa información para el estudio de las interacciones celulares que dan lugar a la codificación de la información para el movimiento a nivel de la retina de vertebrados.

Subvencionado por el Proyecto Europeo CORTIVIS (QLK6-CT-2001-00279)

O 30

PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS DE LA CORTEZA VISUAL PRIMARIA QUE RECIBEN CONEXIONES DIRECTAS DEL GENICULADO

Yeh CI ^{a,b}, Stoelzel CR ^a, Weng C ^{a,b}, Alonso JM ^{a,b}

^a Department of Psychology, Univ. de Connecticut, USA.

^b Department of Biological Sciences, SUNY, USA

La corteza visual primaria del gato recibe información del núcleo geniculado a través de dos vías principales: la vía X y la vía Y. Las células X suman las entradas retinales de forma aproximadamente lineal (una célula centro-on responde tres veces más fuerte si un estímulo blanco cubre 3/4 del campo receptor que si cubre 1/4). Por el contrario, las células Y suman las entradas de forma no lineal (la respuesta es similar para estímulos blancos que cubren 3/4 o 1/4 del campo receptor). En la corteza visual primaria, células con campos receptores complejos muestran propiedades no lineales muy parecidas a las células Y, sin embargo, solo una pequeña proporción recibe conexión talámica directa. ¿Qué características comparten estas células corticales que reciben conexión de células Y? Para contestar a esa pregunta registramos simultáneamente de células talámicas y corticales conectadas monosinápticamente. Nuestros resultados indican que las células corticales que reciben conexión Y comparten muchas propiedades en común: 1) todas muestran respuestas no lineales; 2) todas responden a estímulos presentados brevemente en el campo visual (15-30 ms); 3) en la mayoría, líneas blancas y negras en movimiento generan respuestas en diferentes regiones del campo receptor. Algunas de estas propiedades (2,3) son más típicas de células simples que de complejas, por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las células Y conectan un tipo de célula cortical con propiedades intermedias simple/compleja.

O 31

PAPEL MODULADOR DE LOS RECEPTORES METABOTRÓPICOS DE GLUTAMATO (MGLUR5) EN EL NÚCLEO GENICULADO LATERAL DEL GATO

De Labra C, Rivadulla C, Martínez L, Cudeiro J

NEUROcom (Neurociencia y Control Motor), Departamento de Medicina, Universidad de A Coruña

En el núcleo geniculado lateral (NGL) del gato, los receptores metabotrópicos de glutamato modulan el tránsito de información visual hacia la corteza. Los mGluR1 controlan los efectos mediados por las aferencias corticotálamicas, mientras que los mGluR5 se han asociado con las aferencias retinianas y la modulación de la liberación de GABA por las interneuronas.

En este trabajo estudiamos el papel de los mGluR5 mediante la eyección ionotórfica de agonistas y antagonistas en gatos anestesiados centrándonos en su efecto sobre la respuesta visual de las células talámicas, así como su posible interacción con otros neurotransmisores. La aplicación de CHPG (agonista mGluR5) indujo un aumento de la respuesta en el 40% de las células y una disminución en el 27% (33% sin modificaciones); la eyección del antagonista MPEP produjo el efecto opuesto. En ningún caso se afectó la estructura espacio-temporal del campo receptor. La aplicación de MPEP redujo de forma significativa la actividad excitatoria inducida por la eyección de NMDA, AMPA, ACh y CHPG en el 60% de las células estudiadas.

Los resultados demuestran un papel destacado para los mGluR5 en el tálamo modulando la respuesta de las neuronas del NGL ante la estimulación visual, pero de una forma más compleja a la sugerida en experimentos *in vitro*, en donde la activación del receptor produce un aumento de la actividad inhibitoria.

Financiado por MCYT-BFI2002-03200. C. De Labra es una becaria posdoctoral del MECID.

Transmisión serotoninérgica

Moderadores: A. Pazos y R. Cortés

O 32

PAPEL DE LA CaMKII DE HIPOCAMPO DE RATA EN EL DÉFICIT DE APRENDIZAJE INDUCIDO POR ACTIVACIÓN DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5HT1A

Moyano S, Frechilla D, Del Río J

Departamento de Farmacología, Universidad de Navarra. Pamplona

El 8-OH-DPAT, agonista selectivo del receptor serotoninérgico 5HT1A, produjo un déficit en la adquisición de un aprendizaje de evitación pasiva en rata. En el hipocampo de ratas sacrificadas 1 h después del ensayo de aprendizaje, se encontró un aumento de la expresión en membrana de CaMKII y de su forma fosforilada, así como de la actividad de dicha enzima. El aumento de CaMKII inducido por el aprendizaje fue prevenido por administración de una dosis baja de 8-OH-DPAT (0,1 mg/kg). Este agonista serotoninérgico redujo, así mismo, la actividad de la PKA en animales sometidos al ensayo de aprendizaje e incrementó la expresión en membrana y la actividad de la fosfatasa 1 (PP1). Todos los cambios inducidos por 8-OH-DPAT fueron revertidos por el antagonista selectivo de receptores 5HT1A WAY-100635, indicando efectos específicos de la activación de este subtipo de receptor serotoninérgico.

Los resultados sugieren que el déficit en el proceso de retención de aprendizaje mediado por el receptor 5-HT1A es consecuencia del aumento en la actividad de PP1, que posiblemente se deba a una disminución, por inhibición de la PKA, en la fosforilación del «inhibidor-1», proteína inhibidora de PP1. Esto da lugar a una disminución en la actividad de CaMKII fosforilada, enzima clave en la formación de memoria. Los resultados aportan un mecanismo molecular para los déficits cognitivos inducidos por estimulación de receptores 5-HT1A de hipocampo.

Financiado por MCyT, BFI2001-1602 y EC, QLG3-CT2002-00809.

O 33

EFFECTO DE WAY-100635, ANTAGONISTA 5-HT1A, SOBRE MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS A PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

Schiapparelli L, Frechilla D, Del Río J

Departamento de Farmacología, Universidad de Navarra. Pamplona

La serotonina (5-HT) tiene un importante papel en procesos de aprendizaje y memoria. Es sabido que la activación de receptores postsinápticos 5-HT1A produce déficit cognitivos en diversos paradigmas experimentales, habiéndose sugerido que el bloqueo de estos receptores podría ser útil en el tratamiento de síndromes que cursan con pérdida de memoria. En este contexto, el antagonista WAY-100635 previene el deterioro cognitivo inducido por bloqueo de receptores NMDA o AMPA. En estudios sobre la implicación de receptores 5-HT1A en procesos de memoria, encontramos que el antagonista WAY-100635 incidía de modo directo sobre algunos de los eventos moleculares analizados. Así, la administración de WAY-100635 (0,5 mg/kg) indujo a corto plazo (1 h 45 min) un aumento de los niveles de la forma autofosforilada en Thr286 de la enzima CaMKII en

membranas de hipocampo que se acompañó de un incremento significativo en la actividad de la kinasa. Así mismo se observó una mayor actividad de la enzima PKA en hipocampo. El efecto sobre las enzimas CaMKII y PKA se tradujo a más largo plazo (3 h 45 min) en un aumento en la fosforilación de la subunidad AMPA GluR1 en Ser831 y Ser845 en membranas de hipocampo similar al que se produce en ratas control sometidas a aprendizaje. Estos resultados contribuyen a explicar la reversión por este antagonista 5-HT1A de los déficits cognitivos que inducen antagonistas de receptores de glutamato.

Financiado por MCyT, BFI2001-1602 y EC, QLG3-CT2002-00809.

O 34

LOCALIZACIÓN CELULAR DE LOS mRNAs DE LOS RECEPTORES 5-HT1A, 5-HT1B y α 1B ADRENÉRGICOS EN LOS NÚCLEOS DEL RAPE

Serrats J, Mengod G, Cortés R

Departamento de Neuroquímica, IIBB-CSIC, (IDIBAPS). Barcelona

Los receptores 5-HT1A y 5-HT1B de la serotonina y el adrenoceptor α 1B son los principales receptores implicados en el control de las neuronas serotoninérgicas de los núcleos dorsal (DR) y medial (MnR) del rafe. En el presente estudio se ha investigado la colocalización de los mRNAs que codifican para estos receptores con el mRNA del transportador de 5-HT (5-HTT; neuronas serotoninérgicas) y con el mRNA de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; neuronas gabérgicas) mediante hibridación *in situ* de doble marcaje utilizando sondas marcadas con digoxigenina o 33P.

En el DR, se detectaron los mRNAs de los tres receptores en todas las neuronas serotoninérgicas y en una población minoritaria de células gabérgicas. Asimismo, en el MnR, se observó señal del mRNA de los receptores 5-HT1A, 5-HT1B, o α 1B la mayor parte de neuronas serotoninérgicas; sin embargo se identificaron células positivas para el mRNA del 5-HTT que no presentaban expresión de estos receptores. Es también de destacar que en el MnR no se detectó marcaje correspondiente a los receptores 5-HT1B ni α 1B en las células gabérgicas.

Estos datos sugieren importantes diferencias en el control de las células serotoninérgicas del DR y del MnR, a la vez que proporcionan una base anatómica a diversas hipótesis sobre la localización celular de los receptores que median directa o indirectamente la regulación de la actividad serotoninérgica.

Financiado por MCyT (SAF 2000-0212). J.S. es becario IDIBAPS

O 35

LOCALIZACIÓN CELULAR DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT1A, 5-HT2A y 5-HT3 EN NEURONAS PIRAMIDALES E INTERNEURONAS GABÉRGICAS DE CORTEZA PREFRONTAL DE RATA

Santana N, Artigas F, Mengod G

Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC-IDIBAPS

La corteza prefrontal recibe una gran densidad de terminales serotoninérgicos y está enriquecida en receptores 5-HT1A y 5-HT2A a través de los cuales la serotonina modula la actividad de las neuronas piramidales (5-HT2A-excitación, 5-HT1A-inhibición). Mediante doble hibridación *in situ*, hemos observado una coexpresión del 80 % de los ARNm de ambos receptores en neuronas de corteza prefrontal de rata y ratón (Bortolozzi et al, SENC 2003). En el presente trabajo hemos estudiado la expresión de ambos receptores en neuronas piramidales e interneuronas gabérgicas de corteza prefrontal de rata mediante la técnica de doble hibridación *in situ*. Los porcentajes de coexpresión de los ARNm de ambos receptores y de la GAD, marcador de neuronas gabérgicas, son de un 15% para el receptor 5-HT1A y de un 17% para el receptor 5-HT2A. Estos datos concuerdan con la alta

coexpresión de los ARNm de ambos receptores con el transportador vesicular de glutamato, marcador de neuronas piramidales en corteza. Asimismo, una subpoblación de neuronas GAD-positivas, expresan el ARNm del receptor 5-HT₃. Estos estudios aportan nuevos datos para comprender la multiplicidad de las acciones de la 5-HT en corteza prefrontal.

O 36

EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT₆ EN HIPOCAMPO DE ENFERMOS DE ALZHEIMER

Arroyo-Jiménez MM^a, Hernández-Sansalvador M^a, Mohedano-Moriano A^a, Hirs W^b, Marcos^a, Martínez-Marcos A^a, Blaizot X^a, Artacho-Pérula E^a, Cebada-Sánchez S^a, Del Río J^c, Insausti R^a

^aFacultad de Medicina, Laboratorio de Neuroanatomía Humana, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, España. ^bNeurología-CEDD, Glaxo Smith Kline, Harlow, UK. ^cDepartamento de Farmacología, Facultad de Medicina de Navarra, Pamplona, España

Además de la aceptada disfunción del sistema colinérgico en pacientes con enfermedad de Alzheimer, en los últimos años han aumentado las evidencias que incluyen, entre otros, el sistema serotoninérgico como un elemento que participa en la fisiopatología de dicha enfermedad.

Entre los diferentes receptores serotoninérgicos que podrían estar implicados, destaca 5HT₆, que parece mediar la neurotransmisión colinérgica en el cerebro, y puede además constituir una nueva herramienta terapéutica para ciertas disfunciones de la memoria y el aprendizaje.

Empleando el ligando 125I-SB258585 específico para 5HT₆, hemos llevado a cabo estudios de unión de ligando (*binding*) en secciones del cuerpo del hipocampo de casos controles y de enfermos de Alzheimer. Los autorradiogramas en los controles demuestran una distribución preferente de los sitios de unión de 5HT₆ en la capa polimórfica del giro dentado y en la proyección a CA3 por las fibras musgosas, especialmente cuando se compara con otras regiones del hipocampo como por ejemplo CA1. Estudios de cuantificación determinarán si el patrón de distribución de 5HT₆ en secciones de cerebro de enfermedad de Alzheimer es significativamente diferente a los controles.

Subvencionado por: Programas de potenciación de grupos consolidados. GC-02-022. Consejería de Ciencia y Tecnología de la JCCM.

O 37

MODIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN POR LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE FLUOXETINA

Pazos A, Castro ME, Del Olmo E, Díaz A, Valdizán EM

Departamento de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria, Santander

El estudio del mecanismo de acción de los fármacos antidepresivos se ha centrado en los últimos años, en la modificación de la señalización sináptica a nivel postreceptorial. La fluoxetina, uno de los antidepresivos más utilizados en la clínica, actúa bloqueando la recaptación de 5-HT; de esta manera, el incremento mantenido de 5-HT tras su administración crónica podría inducir cambios postreceptoriales.

En este trabajo, hemos valorado la activación de las proteínas Gi/o mediante la fijación de [³⁵S]GTPγS así como la actividad basal de la AC mediante la cuantificación de los niveles de AMPc, en muestras de cerebro de rata tras el tratamiento crónico (14 días) con 10mg/kg/día de fluoxetina. Nuestros resultados muestran una disminución significativa de la activación basal de las proteínas Gi/o en distintas regiones cerebrales como el hipocampo (-26%), el ventral pálido (-20%), y el caudado-putamen (-20%). Esta disminución se acompañó de un incremento significativo de los niveles de AMPc en la corteza (41%), el hipocampo (74%) y el

estriado (87%). El incremento de 5-HT secundario al bloqueo en su recaptación ocasionaría una activación mantenida de receptores acoplados a proteínas Gi(5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}). Esta activación mantenida de proteínas Gi sería la responsable del incremento en los niveles de AMPc debido a una sensibilización compensatoria de la AC a estímulos activadores. Financiado: BF12001/0592

O 38

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON VENLAFAXINA SOBRE EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO

Castro ME, Díaz A, Pena R, Pazos A

Departamento de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander

En este trabajo se analizan las modificaciones producidas, en la rata, sobre el eje receptorial 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} (receptor-proteína G) tras el tratamiento crónico con venlafaxina (40 mg/kg/día, 14 días). El marcaje de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} se realizó mediante la fijación de [³H]8-OH-DPAT y [³H]GR125743 a secciones tisulares, respectivamente. El nivel de activación de las proteínas G acopladas a estos subtipos de receptores se realizó mediante la cuantificación de la fijación de [³⁵S]GTPγS en secciones tisulares tras la coincubación con el agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (10 μM) solo y en combinación con el antagonista selectivo 5-HT_{1A} WAY100635 (10 μM) para el receptor 5-HT_{1A}; y con el agonista (GTI, 10 μM) solo y en presencia del antagonista SB224289 (10 μM) para el receptor 5-HT_{1B}. En el núcleo dorsal del rafe y en el hipocampo, el tratamiento crónico con venlafaxina no modificó la densidad de receptores 5-HT_{1A} ni su capacidad de acoplamiento a la proteína G. Por el contrario, se observó un incremento significativo en la densidad de receptores 5-HT_{1B} en el globo pálido (Bmax = 188,8 ± 8,1 fmol/mg de tejido venlafaxina vs 159,2 ± 6,3 fmol/mg de tejido vehículo, p < 0,05) y en el CA1 del hipocampo (Bmax = 33,4 ± 5,3 fmol/mg de tejido en venlafaxina vs 18,0 ± 2,4 fmol/mg de tejido en el vehículo, p < 0,05) sin observarse cambios en la capacidad de activación de la proteína G.

Financiación: BF12001/0592, SAF980064 y FAES-FARMA S.A.

O 39

ACTUACIÓN DE LOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS 5HT_{1A} EN LA RESPUESTA NORADRENÉRGICA BULBOPROTUBERANCIAL EN EL ESTRÉS EMOCIONAL EN RATA

Doña A^a, Rioja J^a, Santín L^b, Miñano JF^c, Tavares E^c, González-Barón S^a, Aguirre JA^a

^aDepartamento de Fisiología, Universidad de Málaga. ^bDepartamento de Psicobiología, Universidad de Málaga. ^cDepartamento de Farmacología, Universidad de Sevilla

Los receptores 5HT_{1A}, implicados en la respuesta al estrés, tienen un papel controvertido. Se estudió en ratas Sprague-Dawley: 1) efectos del agonista de los receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, sobre los niveles (HPLC) de NA en protuberancia y bulbo; 2) efecto del 8-OH-DPAT sobre la activación neuronal (c-Fos IR) en células TH IR, con o sin estrés por inmovilización (INMO:2h). Grupos: 1) Salino, 2) INMO, 3) 8-OH-DPAT, y 4) INMO, pretratados 30 min antes con 8-OH-DPAT (8-OH-DPAT+INMO). En la protuberancia, la INMO disminuyó la NA (26%) vs. salino y el 8-OH-DPAT mostró una tendencia (p=0,056) a disminuir la NA (18%). En el grupo 8-OH-DPAT+INMO no hubo variación. La ratio DOPAC/NA permaneció invariable excepto en el 8-OH-DPAT+INMO que aumentó. En el bulbo disminuye la NA (19%) en el grupo 8-OH-DPAT+INMO respecto a otros, mientras que DOPAC/NA aumenta respecto a 8-OH-DPAT (190%) o INMO (200%). El 8-OH-DPAT y la INMO activan células NA, TH IR+ (LC, A5), aunque

en 8-OH-DPAT+INMO aumentó en un 40% la c-Fos IR en células TH IR. En las áreas TH IR (A1/C1, A2/C2, Solitario C3) del bulbo se activan más células con la INMO (15%) que con 8-OH-DPAT, aunque en 8-OH-DPAT+INMO aumenta c-Fos IR respecto a 8-OH-DPAT (20%) o INMO (15%). Las variaciones de NA en la protuberancia y en el bulbo y el aumento de la ratio DOPAC/NA producidos por 8-OH-DPAT o por la INMO sugieren una estrecha relación entre la respuesta noradrenérgica en el estrés y la activación de los receptores 5HT1A. Financiación: DGICYT PM99-0159, PM99-0163 y FIS 00-1066.

Desarrollo y plasticidad

Moderadores: J.A. Armengol y E. Vecino

O 40

NEURAL TUBE SIGNALS ARE INVOLVED IN THE REGIONALISATION OF THE OTIC VESICLE

Aragón F^a, Ulloa E^a, Cereghini S^b, Alsina B^a, Giráldez F^a, Pujades C^a

^aDCEXS, Universitat Pompeu Fabra. Barcelona, Spain.

^bCNRS UMR7622, Lab. Biologie du Développement, UPMC. Paris, France

The inner ear is a complex sensory organ responsible for the senses of hearing and balance in vertebrates. Development of inner ear starts with the formation of the otic placode adjacent to the prospective hindbrain at the 3-5 somites stage. At this stage the hindbrain region of the central nervous system (CNS) undergoes a segmentation process that leads to the formation of 7-8 morphological bulges called rhombomeres. Gene inactivation in mice suggested that some of the genes that participate in hindbrain segmentation are also involved in the control of otic development. Recently, it has been shown that the transcription factor vHNF1 may be one of those genes in zebrafish (Sun and Hopkins. *Genes Dev* 2001; 15: 3217-29). We analysed hindbrain molecular signals that may affect inner ear development. Particularly, we addressed which are the roles played by hindbrain segmentation genes –like the transcription factor vHNF1– in the regionalisation of the otic vesicle. With that purpose mVHNF1 was ectopically expressed within the hindbrain by means of in ovo electroporation in the chick. vHNF1 appears to control the expression profiles of MafB, Krox20, Hoxb1 and Fgf3 in the neural tube. These alterations in the hindbrain segmentation cascade generate a loss of regionalised expression pattern of Lmx1 in the otic vesicle. The results support a model where the patterning of the otic vesicle depends on adjacent neural tube cues.

O 41

FGF10 AND FGF SIGNALLING ARE REQUIRED FOR THE DETERMINATION OF OTIC NEURAL PRECURSORS

Alsina B, Coll M, Ulloa E, Pujades C, Giráldez F

Biología del Desarrollo, DCEXS, Universitat Pompeu Fabra. Barcelona

The generation of otic neurons is initiated by the early specification of neural precursors in the otic placode epithelium. We have analyzed the expression and function of FGF10 and FGF-signalling during the early stages of the development of otic neurons. FGF10 is expressed in a highly restricted domain overlapping the presumptive neurogenic domain of the otic placode. A study of the expression pattern of FGF10, proneural and neurogenic genes revealed the following sequence in the onset of gene expression: FGF10-LFng>Ngn1-Dll1-Hes5>NeuroD-NeuroM. Neural differentiation genes NeuroD/M persist in ganglionic neuroblasts along Islet1/2 and Tuj1, but not FGF10, or neural determination genes Ngn1 and Delta1. Over-expression of FGF10 or FGF10 delivery in vivo promotes an increase in NeuroD or NeuroM, but

not Delta1. These effects occur only within the proneural-sensory domain of the otic vesicle. FGF receptor inhibition in otic placode explants causes a severe reduction in NeuroD and Delta1 expression with no change in non-neural genes like Lmx1. FGF receptor inhibition does not interfere with neuroblast delamination or proliferation. FGF10 and the inhibition of FGF receptor signalling caused mirrored images on cell-determination and cell proliferation, FGF10 inducing the former and reducing the later. We suggest that local activity of FGF10 is required for the transit of precursors towards a state of cell determination, and that it does so by silencing cell division.

O 42

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE REGULACIÓN AGUDA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS (StAR) EN EL CEREBRO DE LA RATA

Sierra A^a, Lavaque E^a, Azcoitia I^b, Hales DB^c, García-Segura LM^a

^aInstituto Cajal, CSIC. Madrid. ^bDepartamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense. Madrid, España.

^cDepartment of Physiology and Biophysics (M/C901), University of Illinois at Chicago. Chicago, USA

El sistema nervioso central tiene la capacidad de sintetizar esteroides a partir de su precursor colesterol. Estos esteroides regulan el desarrollo y la función de neuronas y células gliales y tienen propiedades neuroprotectoras. La primera etapa de la esteroidogénesis consiste en el transporte de colesterol libre a la membrana mitocondrial interna, donde se transforma en pregnenolona. Este transporte está mediado por la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis StAR. Nuestro estudio hace un detallado análisis de la distribución celular de la expresión de StAR en el cerebro de rata macho, en el período postnatal y adulto. Mediante inmunohistoquímica se reveló que StAR está ampliamente distribuido en el cerebro, en poblaciones neuronales, ependimarias y astrogiales muy específicas. En la mayor parte de las áreas que expresan StAR, la inmunorreactividad aparece en el día postnatal 10; después se incrementa o se mantiene constante hasta el estado adulto. Además StAR se expresa en la zona subventricular en el cerebro adulto, en células proliferantes que incorporan BrdU, así como en capas germinales en el cerebro en desarrollo. Por otra parte, la administración de ácido kaínico, que produce una lesión excitotóxica, induce un incremento agudo y transitorio de RNA mensajero y proteína de StAR. Esto sugiere que la sobreexpresión de StAR, y la modificación consecuente de la esteroidogénesis, podría ser parte de los mecanismos de respuesta del cerebro frente a una lesión.

O 43

ALTERACIÓN EN LA NEUROGÉNESIS CORTICAL EMBRIONARIA DE RATONES CARENTES DEL RECEPTOR DE ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO LPA1

Llebrez-Zayas P^a, Del Arco I^a, Fernández-Llebrez P^b, Rodríguez de Fonseca F^a, Estivill-Torrús G^a

^aFundación de Investigación Hospital Carlos Haya, Hospital Universitario Carlos Haya. Málaga. ^bDept. de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Málaga

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un fosfolípido que actúa como mensajero intercelular a través de receptores específicos (lpA1-4) acoplados a proteína G en un amplio rango de tipos celulares. El primer gen identificado para el receptor de LPA lpA1/vzg-1/edg-2, se expresa ampliamente durante el desarrollo cerebral en las regiones proliferativas neurogénicas. La delección dirigida de lpA1 en ratones ha demostrado la necesidad de esta vía de señalización en el desarrollo del sistema nervioso central. Además, la administración exógena de LPA induce cambios morfo-fisiológicos en neuroblastos corticales y neuronas hipocámpales sugiriendo una función en la regulación de procesos

cognitivos. La disponibilidad de ratones mutantes para el receptor *lpA1*, nos ha permitido caracterizar el desarrollo cerebral y estudiar el papel del LPA en la neurogénesis.

Para el estudio se han empleado estudios de marcadores de proliferación y se han usado anticuerpos dirigidos contra marcadores específicos de las distintas poblaciones neurales. El análisis de las regiones neurogénicas, tanto mediante inmunocitoquímica sobre secciones cerebrales, como mediante el estudio *in vitro* de la dinámica proliferativa de neuroblastos corticales embrionarios, nos ha mostrado cómo, desde los primeros estadios de desarrollo, en E14.5 y, coincidiendo con la fase más proliferativa neural, se manifiestan alteraciones claras durante la corticogénesis, tanto a nivel proliferativo como de maduración neuronal.

O 44

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL REPRESOR TRANSCRIPCIONAL DREAM EN EL CEREBRO DE RATONES TRANSGÉNICOS

Torres B^a, Barrio J^a, Savignac M^a, Gutiérrez-Adán A^b, Pintado B^b, Mellström B^a, Naranjo JR^a

^a CNB-CSIC, Campus Cantoblanco. ^b Inia. Madrid

El represor transcripcional DREAM (modulador antagonista de sitios DRE) es la primera proteína capaz de fijar calcio (gracias a la presencia de cuatros motivos *EF-hand*) y a su vez unirse como tetrámero a sitios específicos en el DNA (sitios DRE) y reprimir la transcripción. La unión del calcio a los motivos *EF-hand* determina un cambio conformacional de DREAM que la hace incapaz de unirse al sitio DRE y por lo tanto deja de reprimir la transcripción. La mutación de dos residuos específicos en cualquiera de los motivos funcionales *EF-hand* genera un mutante dominante negativo de DREAM (dnDREAM) insensible a calcio y por lo tanto presenta un efecto represor permanente. La secuencia DRE se localizó inicialmente en el gen humano de la prodinorfina, un gen implicado en procesos de memoria y aprendizaje, pero un análisis posterior, ha revelado la existencia de sitios DRE en un grupo numeroso de genes que incluye desde factores de transcripción de activación temprana como c-Fos o ICER, proteínas que modulan la comunicación interneuronal como Homer o sinaptofisina, genes que codifican distintos neuropeptidos como es el caso de prodinorfina hasta factores neurotróficos como BDNF.

En el laboratorio se han desarrollado líneas transgénicas de ratones que expresan distintos mutantes de dnDREAM en neuronas mediante un vector de direccionamiento que incluye el promotor de la CaMK-II α . Tras la caracterización de la expresión del transgen en el cerebro se está estudiando la expresión de los diferentes genes susceptibles a la regulación por DREAM en las distintas áreas del SN. El patrón de expresión diferencial de los genes regulados por DREAM nos permitirá la caracterización fenotípica de cada una de las líneas de ratones transgénicos.

O 45

ORGANIZACIÓN SEGMENTARIA DE LAS EFERENCIAS VESTIBULOCULARES Y VESTIBULOSPINALES EN EL EMBRIÓN DE RATÓN DE 16,5 DÍAS POST COITUM

Díaz C^a, Pasqualetti M^b, Rijli F^b, Glover JC^c

^a Facultad de Medicina y Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, UCLM. Albacete, España. ^b Instituto de Genética y Biología Molecular y Celular, CNRS/INSERM/ULP. Estrasburgo, Francia. ^c Departamento de Fisiología, Universidad de Oslo, Noruega

Estudios en embriones de aves indican que las neuronas eferentes vestibulares se agrupan en acúmulos que se correlacionan con los rombómeros o con subdivisiones internas de los mismos. ¿Ocurre lo mismo en otros vertebrados? En el presente trabajo estudiamos las proyecciones vestibuloculares y vestibulospinales en embriones de ratón de 16,5 días *post coitum* trazadas con dextranamina biotinada. Entre los tres grupos vestibulospinales observados, uno proyecta ipsilateralmente por el tracto

vestibuloespinal (LVST) y los otros dos, ipsi o contralateralmente, por el fascículo longitudinal medial (iMVST y cMVST). Los grupos vestibuloculares de proyección contralateral están segregados en dos grupos, rostral y caudal (cR-VO y cC-VO) y un único grupo proyecta ipsilateralmente (i-VO). Para estudiar la topografía segmentaria de las neuronas vestibulospinales y vestibuloculares utilizamos ejemplares heterocigotos de dos líneas de ratones transgénicos para el gen *Hoxa2*, expresado en el rombómero r2 en una línea y en r3 y r5 en la otra. Los grupos vestibulospinales cMVST y iMVST se restringen, respectivamente, a r5 y a r6, y LVST se extiende a r4 y r5. El grupo vestibulocular i-VO se localiza preferentemente en r2 y r3, cR-VO por delante del límite r2/r3 y cC-VO se extiende desde r4 a r6. La comparación de nuestros datos con estudios en otros vertebrados muestra que varios aspectos del mosaico conectivo de las eferencias del complejo vestibular están conservados evolutivamente.

O 46

TRASPLANTE DE PRECURSORES NEURONALES DIFERENCIADOS A FENOTIPO GABÉRGICO EN MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Bosch M^a, Pineda JR^a, Cattaneo E^b, Alberch J^a, Canals JM^a

^a Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, IDIBAPS. Barcelona. ^b Institute of Pharmacological Sciences, Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases, University of Milano. Milan, Italy

Los trasplantes de células madre neuronales pueden ser una alternativa para el tratamiento de la corea de Huntington (HD). En esta enfermedad, la mutación del gen de la huntingtina conduce a una degeneración selectiva de las neuronas gabérgicas de proyección del núcleo estriado. El objetivo del presente trabajo es la diferenciación de precursores neuronales hacia un fenotipo gabérgico para su posterior trasplante en un modelo experimental de la HD. Usando la línea de precursores neuronales inmortalizados ST14A, hemos desarrollado un método para inducir el fenotipo gabérgico, potenciando al máximo su supervivencia *in vitro*. Nuestros resultados indican que con el tratamiento secuencial con ácido retinoico y KCl en un medio suplementado con 0,5% de suero fetal se consigue un alto grado de diferenciación, una reducción de la tasa de proliferación y un incremento de los marcadores de fenotipo gabérgico, manteniendo una supervivencia del cultivo de hasta 15 días *in vitro*.

Seguidamente hemos realizado trasplantes intraestriales de estas células diferenciadas, en un modelo excitotóxico de la HD. Al cabo de tres días *in vivo*, estas células desarrollan signos morfológicos de diferenciación, como la elaboración de largos procesos, no adquieren fenotipos gliales y siguen conservando el fenotipo gabérgico.

Financiado por: CICYT (SAF2002-00314; SAF2002-00311); Ministerio de Ciencia y Tecnología, Generalitat de Catalunya, Fundació Ramón Areces y Fundació La Caixa.

O 47

Otx-2 ES NECESARIO PARA EL CONTROL DEL PATRÓN ANTEROPOSTERIOR Y DORSOVENTRAL EN EL DESARROLLO DEL MESENCÉFALO

Puelles E^a, Acampora D^{a,b}, Annino A^a, Alfano I^a, Usiello A^c, Ang SL^d, Wurst W^e, Simeone A^{a,b}

^a MRC Centre for Developmental Neurobiology, King's College London, Guy's Campus, New Hunt's House. London, UK. ^b International Institute of Genetics and Biophysics, CNR. Naples, Italy. ^c Istituto di Biologia Cellulare, CNR. Roma, Italy. ^d Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/Universite Louis Pasteur. Illkirch, Strasbourg, France. ^e Max Planck Institute of Psychiatry. Munich, Germany

El interés de este estudio es entender el papel de *Otx-2* en el desarrollo de la región ístmica, así como la diferenciación de diversas poblaciones neuronales en el mesencéfalo posterior.

Con esta intención hemos generado una cepa transgénica de ratón en la cual Otx-2 puede ser inactivado condicionalmente por la enzima Cre recombinasa controlada por el promotor de En-1. Por lo tanto, inactivamos la expresión de Otx2 en el mesencéfalo posterior.

El análisis fenotípico de estos ratones mostró que los embriones mutantes carecen de la constricción ístmica. Presentan claros defectos en el eje anteroposterior del mesencéfalo. Genes como Gbx2 y Fgf8 presentan una clara rostralización. También encontramos alteraciones en el eje dorsoventral, principalmente en la expresión de Shh que aparece dorsalizada.

Estas alteraciones se reflejaron en estadios tardíos en un posicionamiento y una diferenciación anormal de la región basal del mesencéfalo. La población dopaminérgica se presenta claramente disminuida y el núcleo rojo ausente. Esta área aparece ocupada por la generación de un nuevo grupo de neuronas serotoninérgicas.

Este análisis sugiere que Otx2 es necesario para el desarrollo anteroposterior y dorsoventral del mesencéfalo, controlando la posición y la cascada genética de las moléculas señalizadoras Shh y Fgf8.

Trabajo financiado por MRC Programme (N. G9900955); The Wellcome Trust Programme (Grant N. 062642/Z/00) y The EU BIOTECH Programme (N. QLRT-2000-02310).

Factores neurotróficos

Moderadores: J. Alberch y M. Llovera

O 48

IMPLICACIÓN DE LA NEUROTROFINA BDNF EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Canals JM^a, Pineda JR^a, Torres J^a, Muñoz MT^a, Bosch M^a, Ernfrors P^b, Alberch J^a

^aDepartamento de Biología Celular y Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, IDIBAPS, Universitat de Barcelona. ^bLaboratorio de Neurobiología Molecular, Dept. MBB, Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia

Se ha descrito que los ratones transgénicos para la enfermedad de Huntington tienen alterada la expresión de BDNF. Para estudiar este posible papel endógeno de esta neurotrofina hemos generado un ratón transgénico para la huntingtina y deficiente, a su vez, para BDNF.

Nuestros resultados indican que los ratones dobles mutantes muestran deficiencias en el comportamiento motor, mostrando una afección prematura y más grave. La falta de coordinación motora que estos animales muestran se corresponde con un menor tamaño del núcleo estriado. Esta disminución, está acompañada de un menor número y tamaño de neuronas de proyección (DARPP32-positivas) del núcleo estriado en los animales dobles mutantes. Por el contrario, el número de interneuronas positivas para parvalbúmina no está alterado. Nuestros resultados también demuestran que el BDNF tiene un papel muy importante sobre las neuronas colinérgicas de este núcleo ya que hay una fuerte reducción de estas neuronas en el animal doble mutante. En estos animales, nuestros resultados no demuestran ninguna afección de las neuronas piramidales de la corteza cerebral.

En conclusión, estos resultados demuestran que el BDNF tiene un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad de Huntington.

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (SAF2002-00314 y SAF2002-00311) del Ministerio de Educación y Ciencia. JRP tiene una beca FPU del Ministerio de Educación Cultura y Deporte y MB es becario de la Universidad de Barcelona.

O 49

IMPLICACIÓN DEL PRO-NGF EN LA MUERTE CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Pedraza CE^a, Podlesny P^a, Ferrer I^b, Iglesias M^a, Espinet C^a

^aLaboratorio de Neuropatología Molecular, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de Lleida. ^bHospital Príncipes de España, Ciudad Universitaria de Bellvitge, Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica, Universidad de Barcelona

La neurotrofina NGF (*nerve growth factor*) es una proteína de bajo peso molecular (>14 kDa) producto de la proteólisis enzimática de precursores de mayor tamaño (pro-NGF). Se ha descrito la participación de la forma madura del NGF en el desarrollo y diferenciación neuronal y existen datos contradictorios acerca de su implicación en la activación de señales intracelulares que conllevan a muerte celular programada (apoptosis) o a supervivencia celular. Por otro lado, se sabe que el pro-NGF se une con alta afinidad al receptor de neurotrofinas p75 induciendo apoptosis en cultivos primarios de oligodendrocitos y ganglio cervical superior. También se ha descrito que el pro-NGF es la forma mayoritaria de NGF en el cerebro humano. En este trabajo hemos detectado, usando anticuerpos específicos contra el pro-NGF o contra la proteína madura, un aumento de 4 veces en los niveles de prepro-NGF glicosilado en cerebros *post-mortem* de pacientes de la enfermedad de Alzheimer, que se correlaciona con el estadio de la enfermedad y que varía de acuerdo a la zona del cerebro analizada. Por medio de técnicas cromatográficas hemos purificado prepro-NGF a partir de extractos de cerebro humano. Así mismo hemos obtenido la forma inmadura de pro-NGF mutada en lugares de corte por proteasas implicadas en su maduración. La actividad biológica de estas proteínas y su capacidad de unión a p75 está siendo estudiada en modelos de cultivos neuronales y gliales.

O 50

NEUROPROTECCIÓN Y AUMENTO DE LA SUPERVIVENCIA EN UN MODELO ANIMAL DE ELA TRAS LA ADMINISTRACIÓN VIRAL DE FACTORES NEUROTROFÍCOS

Lladó J^a, Kaspar BK^b, Sherkat N^b, Rothstein JD^a, Gage FH^b

^aDepartment of Neurology, Johns Hopkins University, Baltimore, USA.

^bThe Salk Institute, La Jolla, California, USA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa letal que se caracteriza por la pérdida selectiva de motoneuronas (MNs). La mayoría de pacientes presentan una forma esporádica de ELA, pero también existe una forma hereditaria, ligada a mutaciones en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1). La sobreexpresión de SOD1 mutante en ratones y ratas se utiliza como modelo de ELA ya que recapitula sus características clínicas y patológicas. Recientemente se ha descubierto que vectores virales adenoasociados (AAV) diseñados para producir genes de interés, son transportados de forma retrógrada desde los terminales presinápticos al soma neuronal, lo que permite una producción sostenida de estos genes (Kaspar et al. Mol Ther 2002). El objetivo de este estudio fue investigar la eficacia de varios factores neurotróficos (FNs) en el ratón modelo de ELA, a través de la administración de AAV-FNs en los músculos intercostales y gastroneumio, y su transporte retrógrado a las MNs que los enervan, típicamente afectadas en ELA. La inyección de AAV-FNs en ratones presintomáticos retrasó la aparición de las primeras manifestaciones clínicas, y prolongó su esperanza de vida (30%). El estudio histológico de la médula espinal reveló que el tratamiento fue capaz de retrasar los cambios patológicos típicos (pérdida de MNs y astrogliosis). La inyección de AAV-FNs fue también efectiva en ratones que ya presentaban síntomas iniciales de ELA, retrasando el avance de la enfermedad.

O 51**LA EXPRESIÓN DE LAS NEUROTROFINAS Y SUS RECEPTORES SE CONSERVA EN LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA ADULTA INDEPENDIENTEMENTE DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO**García M^a, Ruiz-Ederra J^a, Hernández M^a, Urcola J^a, Hernández-Barbáchano E^a, Araiz J^b, Durán J^b, Vecino E^a^a Departamento de Biología Celular e Histología. Universidad del País Vasco.^b Departamento de Oftalmología. Universidad del País Vasco

Los cultivos celulares permiten estudiar aspectos que no podrían ser analizados *in vivo*. Sin embargo, el entorno del cultivo celular es muy diferente al encontrado *in vivo*, debido, por ejemplo, a las distintas condiciones químicas del medio. En el presente estudio, hemos comparado la distribución de las neurotrofinas (NTs) y sus receptores en las células ganglionares de la retina (CGR) de cerdo adulto, tanto *in vivo* (secciones de retina) como *in vitro* (cultivos primarios de retina). Las condiciones de los cultivos fueron: (1) sobre un sustrato de laminina-polilisina en medio químicamente definido, (2) añadiendo factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), (3) sobre un sustrato de células de Müller confluentes. Los resultados *in vivo* muestran la presencia de BDNF y su receptor de alta afinidad TrkB, y de neurotrofina 3 en las CGR, así como del receptor de baja afinidad p75 en las células de Müller. El factor de crecimiento nervioso y su receptor TrkA mostraron un menor marcaje, mientras que la neurotrofina 4 y el receptor TrkC no se detectaron. La expresión de NTs y sus receptores en las CGR en cultivo es similar a la observada *in vivo*. Sin embargo, se observa la expresión de p75 y TrkA en una subpoblación de CGR que en secciones no se puede identificar. Las distintas condiciones de cultivo no afectan a la expresión de las NTs y sus receptores. Trabajo financiado por la Comunidad Europea (Pro Age Ret QLK6-2000-00569) y la Universidad del País Vasco (1/UPV00075.327-E14887/2002)

O 52**LA ACTIVACION DE LA PI3K MEDIADA POR GDNF REQUIERE DE CALCIO INTRACELULAR Y CALMODULINA: IMPLICACIÓN EN LA SUPERVIVENCIA NEURONAL**Pérez-García MJ^a, Ceña V^b, DePablo Y^a, Llovera M^a, Comella JX^a, Soler RM^a^a Grup de Neurobiologia Molecular, Dept. de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida. ^b Universidad de Castilla-La Mancha, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas

La actividad eléctrica de las neuronas y la estimulación de distintos receptores tirosina quinasa producen incrementos moderados en la concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i), regulando la activación de vías de señalización intracelular y la supervivencia neuronal. Estos efectos están mediados por calmodulina (CaM) cuando se produce la despolarización de la membrana. Sin embargo, la implicación de CaM en el modelo de receptores con actividad tirosina quinasa es poco conocida. La vía de la PI3K/PKB está implicada en la mediación de la supervivencia neuronal inducida por los factores neurotróficos (neurotrofinas, ligandos de la familia de GDNF, etc.). Los antagonistas de la CaM bloquean la activación de la PKB inducida por las neurotrofinas, sugiriendo la implicación de la CaM en la supervivencia mediada por estos factores. En el presente trabajo se demuestra que CaM regula la activación de PKB en cultivos primarios de motoneuronas tratadas con GDNF. La estimulación de estas células con GDNF provoca un incremento de la [Ca²⁺]_i por movilización del Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares. Los antagonistas de la CaM inhiben la actividad *in vitro* de la PI3K y de la PKB, así como la supervivencia. Por tanto los cambios de [Ca²⁺]_i inducidos por GDNF, promueven la supervivencia neuronal a través de la regulación de PI3K por CaM, sugiriendo la importancia de Ca²⁺ y CaM en la activación de vías implicadas en la supervivencia neuronal.

Financiado por FIS(PI021357), Fundació La Caixa i Generalitat de Catalunya. Pérez-García MJ es becaria del MEC.

O 53**IMPLICACIÓN DE LAS VÍAS INTRACELULARES DE LA PI3K Y DE LA MAPK EN LOS EFECTOS TRÓFICOS DEL BDNF EN CULTIVOS DE NEURONAS ESTRIATALES**

Gavaldà N, Pérez-Navarro E, Gratacós E, Alberch J

Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica. Universidad de Barcelona

El BDNF tiene efectos tróficos sobre las distintas poblaciones de neuronas estriatales. Para estudiar las posibles vías de señalización intracelular implicadas en los efectos del BDNF hemos analizado la contribución de la vía de la PI3K y la MAPK utilizando inhibidores específicos en cultivos primarios estriatales.

Nuestros resultados indican que el BDNF activa la vía de la PI3K mediante la fosforilación de Akt, y que es inhibida por LY 294002. También puede activar la vía de la MAPK fosforilando a Erk, y el efecto es bloqueado por el PD 98059.

La presencia de los inhibidores bloquea el aumento del grado de arborización de las neuronas GABAérgicas y las neuronas calbindina-positivas, indicando que tanto la vía de la PI3K como de la MAPK están implicadas en la diferenciación de estas poblaciones neuronales. Sin embargo, sólo los inhibidores de la vía de la PI3K bloquean el efecto del BDNF sobre la supervivencia neuronal.

Nuestros resultados indican que los efectos del BDNF sobre la diferenciación de las neuronas estriatales son a través de la vía de la PI3K y la vía de la MAPK, y que sólo la vía de la PI3K está implicada en la supervivencia de las neuronas estriatales.

Financiación: CICYT (SAF-2002-0314). Fundació La Caixa. Fundación Ramón Areces.

O 54**GDNF Y EFECTO TRÓFICO DE LOS TRASPLANTES INTRAESTRIATALES DE CÉLULAS DEL CUERPO CAROTÍDEO EN ANIMALES PARKINSONIANOS**Villadiego J^a, Méndez-Ferrer S^a, Valdés T^b, Fariñas I^b, López-Barneo J^a, Toledo-Aral JJ^a^a Laboratorio de Investigaciones Biomédicas, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Universidad de Sevilla. Sevilla. ^b Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia. Burjassot, Valencia

Los agregados celulares del cuerpo carotídeo (CC) implantados en el estriado de animales parkinsonianos inducen una recuperación del modelo experimental a nivel histológico, funcional y comportamental. La mejoría observada se debe, más que a la liberación de dopamina por el tejido carotídeo trasplantado, a su efecto trófico sobre la vía nigroestriatal (Toledo-Aral et al. J Neurosci 2003). En el presente trabajo se estudia el origen y participación del potente factor dopaminotrófico GDNF en la recuperación antes mencionada. La expresión del factor neurotrófico se ha analizado usando un ratón heterocigótico GDNF/lacZ que expresa el marcador β-galactosidasa bajo el control del promotor endógeno del GDNF (Sánchez et al. Nature 1996). El CC expresa de forma manifiesta GDNF, característica peculiar del CC que es especialmente destacable si se compara con la ausencia de detección de GDNF en otros tejidos, como la médula adrenal y el ganglio cervical superior, que han sido previamente usados en trasplantes intraestriatales en pacientes y animales parkinsonianos. Mediante estudios de microscopía electrónica y de colocalización en células dispersas se ha podido identificar que sorprendentemente la fuente de GDNF en el CC son las células glómicas productoras de dopamina (tipo I) y no las tipo II o sustentaculares, como se había sugerido previamente. Los agregados celulares de CC una vez trasplantados en el estriado mantienen su capacidad para producir GDNF, sin inducir el implante la

expresión del factor neurotrófico en el parénquima cerebral receptor. Además el tratamiento crónico con la neurotoxina MPTP, que produce parkinsonismo por la destrucción de la vía dopaminérgica nigroestriatal, no afecta a la producción de GDNF en el CC de esos ratones.

Neuroanatomía

Moderadores: S. Guirado y E. Rodríguez

O 55

ESTUDIO QUIMIOARQUITECTÓNICO DEL ARQUIESTRIADO (ARCOPALIO) DE POLLO DURANTE EL DESARROLLO

Suárez J, Real MA, Dávila JC, Guirado S

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Universidad de Málaga

El complejo arquiestriatal, recientemente renombrado arcopalio, forma junto con la cresta ventricular dorsal los derivados histogenéticos del palio lateral y el palio ventral de aves. Los componentes del palio lateral y palio ventral del arcopalio incluyen al arcopalio dorsal (AD), arcopalio intermedio (AI), arcopalio medial (AM) y al núcleo posterior de la amígdala palial (PoA). El patrón de expresión de tres proteínas ligadoras de calcio (calbindina, CB; calretinina, CR; parvalbúmina, PV) y de la sintasa del óxido nítrico (nNOS) ha sido estudiado mediante inmunocitoquímica en estas regiones del arcopalio en distintos estadios de desarrollo del pollo. Nuestros resultados indican un aumento general de células CB+ y una disminución de células nNOS+ a lo largo del desarrollo en todos los núcleos del arcopalio. Los núcleos AD y AM presentan una moderada expresión de células CR+ y nNOS+, mientras que en el resto de los núcleos arcopaliales la escasez de células nNOS+ es evidente. Hasta estadios posnatales no aparecen neuronas PV+ en el arcopalio, y sólo de manera muy pobre en los núcleos AD, AI y PoA. La distribución diferencial de estas proteínas durante el desarrollo pone de manifiesto las subdivisiones de las poblaciones de células gabérgicas en las distintas regiones que constituyen la porción arcopalial del palio lateral y ventral, cuyos derivados son comparables con el complejo claustroromigdalino de mamíferos.

Financiado por BFI 2000-1359-C02-01

O 56

CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DEL CLAUSTRO DEL RATÓN DURANTE EL DESARROLLO

Olmos JL, Real MA, Guirado S, Dávila JC

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Universidad de Málaga

El claustró es una área telencefálica que consta de dos regiones: claustró dorsal y núcleo endopiriforme. Estudios de expresión génica durante el desarrollo proponen un origen del claustró a partir de palio lateral y ventral. Este estudio analiza la expresión de distintos marcadores—GABA, sintasa del óxido nítrico (nNOS), receptor NMDA, calbindina (CB), calretinina (CR) y parvalbúmina (PV)—en el claustró de ratón en embriones, posnatales y adultos usando técnicas inmunocitoquímicas. Los resultados muestran una expresión diferencial de estos marcadores en ambas regiones durante la ontogénesis. En el estadio E16,5 destacamos una tinción fuerte y difusa para nNOS en claustró dorsal siendo escasa en el núcleo endopiriforme, mientras que observamos una amplia expresión de GABA y CB en el núcleo endopiriforme y una escasa presencia en claustró dorsal. En E17,5 el receptor NMDA presenta moderada expresión en núcleo endopiriforme y difusa expresión en claustró dorsal. En E18,5 se observa claramente la CR en claustró dorsal en terminales axónicos dejando una zona interna libre de ellos, manteniéndose el patrón hasta el adulto. La PV aparece en E19,5 en abundantes terminales en el núcleo endopiriforme y una mancha difusa en claustró dorsal. Proponemos una organización

intrínseca distinta entre claustró dorsal y el núcleo endopiriforme acorde con los marcadores estudiados durante la ontogénesis.

Financiado por BFI2000-1359-CO2-01 y FIS 01-0057-01.

O 57

EVOLUCIÓN DEL CEREBRO EMOCIONAL: PROYECCIONES AMIGDALOESTRIATALES EN REPTILES Y MAMÍFEROS

Novejarque A^a, Lanuza E^b, Martínez-García F^a

^aDept. de Biología Funcional i Antropologia Física. Fac. CC Biològiques, Universitat de València. ^bDept. de Biología Cel-lular. Fac. CC Biològiques, Universitat de València

En mamíferos la división basolateral de la amígdala (BL) proyecta a la amígdala central extendida hasta el *shell* del *accumbens* (Acb). Se ha propuesto que la cresta dorsal ventricular posterior (PDVR) y las áreas vecinas del telencéfalo (Lanuza et al., 198, EBN 10:3517-34) constituyen la BL de los reptiles. Para testar esta hipótesis hemos trazado retrógrada y anterógradamente las proyecciones amigdalinas al telencéfalo basal en lagartijas (*Podarcis hispanica*) y ratones.

Los resultados revelaron que tanto la PDVR como el núcleo dorsolateral amigdalino (DLA) y su extensión rostral (córtex lateral profundo) proyectan masivamente al estriado ventral (núcleo de la *stria terminalis*, BST, transición estriado-amigdalina, SAT y Acb) y al pálido ventral. No obstante la proyección del DLA es bilateral y más extensa que la del resto de la BL y alcanza también el estriado dorsal y el pálido lateral. Por tanto las proyecciones del DLA coinciden con las del núcleo basolateral amigdalino de ratón, que proyecta masiva y bilateralmente al caudado-putamen (CPu) y al continuo Acb-BST-amígdala central. Las demás zonas de la BL del ratón (núcleos basomedial y lateral) proyectan a la amígdala central extendida sólo ipsilateralmente y no proyectan al CPu. Estos datos sugieren que el cerebro del amniota ancestral incluía un sistema emocional amigdaloesstriatal que jugó un papel clave en la evolución del telencéfalo.

Financiación: MCyT, FEDER (BFI2002-3535); Generalitat Valenciana (CTIDIA-2002-161)

O 58

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LA INERVACIÓN EFERENTE DEL RECEPTOR AUDITIVO DEL HÁMSTER GPG/Vall

Viñuela A^a, Cantos R^b, Rueda J^b, Sánchez-González MA^a, García-Atarés N^c, López DE^a

^aLaboratorio de Neurobiología de la Audición. Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Universidad de Salamanca. ^bDepartamento de Histología y Anatomía. Universidad Miguel Hernández. ^cDepartamento de Anatomía. Universidad de Valladolid.

Los hámsters de la línea GPG/Vall presentan crisis convulsivas en respuesta a estímulos acústicos. Estudios previos muestran una pérdida de células ciliadas externas (CCE) en el receptor auditivo de estos animales.

La inervación eferente del receptor auditivo tiene su origen en el complejo olivar superior, formando dos sistemas bien diferenciados, el sistema eferente lateral, que proyecta a las fibras aferentes primarias tipo I bajo las células ciliadas internas, y el sistema eferente medial, que contacta directamente con las CCE y utiliza acetilcolina.

Tras la inyección de trazadores retrógrados en la cóclea, se observa que las neuronas olivococleares mediales siguen presentes en estos animales. Al haber desaparecido la diana natural de estas neuronas, nos planteamos estudiar dónde terminan sus axones dentro de la cóclea.

Para ello hemos llevado a cabo histoquímica para acetilcolinesterasa en preparaciones de superficie y secciones paramodiolares de cócleas de estos animales. En las preparaciones de superficie observamos que las fibras eferentes mediales no llegan a la zona de las CCE, aunque las fibras eferentes laterales parecen no estar modificadas. En las secciones paramodiolares de la cóclea se aprecian terminales colinérgicas en la

cercanía de las células de soporte. Aunque sería necesario un estudio ultraestructural para confirmar estos contactos, parece que las fibras eferentes mediales están sinaptando con las células de soporte, las cuales les estarían proporcionando nutrientes necesarios para su supervivencia.

Financiación: BEFI: 00/9418; FIS PI02/1697 y 1/0669; JCyL/FSE: SA 084/01.

O 59

PRESENCIA DE ESTRUCTURAS COMPATIBLES CON AGRESOMA QUE CONTIENEN GLUR1 DURANTE EL DESARROLLO NORMAL DE LAS INTERNEURONAS DE LA MÚDULA ESPINAL DE LA RATA

Casanovas A, Serrando M, Calderó J, Tarabal O, Ribera J, Casas C, Ciutat D, Esquerda JE

Departament Ciències Mèdiques Bàsiques. Universitat de Lleida

En el estudio de la expresión de las subunidades de los receptores de glutamato tipo AMPA en medula espinal de rata, observamos la existencia de unos cuerpos de inclusión citoplasmáticos con inmunoreactividad positiva a la subunidad GluR1 y no a otras subunidades de receptor al glutamato. Estas inclusiones positivas tienen un diámetro entre 1-3 micras y se pueden observar claramente distribuidas en la sustancia gris de la medula espinal, con la excepción de la región del asta ventral. Aparecen durante un periodo definido de desarrollo entre el día 19 embrionario y el día 17 posnatal y asociado solamente a células neuronales. La ultraestructura revela que estas inclusiones están localizadas adyacentes al núcleo y consisten en un material amorfo sin membrana limitante. La inmunohistoquímica revela que las inclusiones presentan inmunoreactividad positiva a la ubiquitina, HSP70 y al proteasoma 20S. Todos estos datos indican que las inclusiones positivas a GluR1 poseen todas las características ultraestructurales e inmunocitoquímicas de la estructura descrita como agresoma. Ya que los agresomas se han descrito en un contexto patológico, son necesarios más estudios para determinar el significado biológico de estas inclusiones.

O 60

EFFECTO DE LA AUTOADMINISTRACIÓN DE MORFINA EN LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA

Ballesteros-Yáñez I^a, Pérez J^b, Benavides-Piccione R^a, Ambrosio E^b, DeFelipe J^a

^a Departamento de Neuroanatomía y Biología Celular. Instituto Cajal, CSIC. Madrid. ^b UNED. Madrid

La exposición crónica a drogas de abuso provoca efectos negativos (tolerancia, sensibilización, dependencia y adicción) que son debidos, en parte, a cambios en la organización del sistema nervioso. Las espinas dendríticas de las células piramidales tienen un papel fundamental en la fisiología y plasticidad de las células piramidales. Además, representan la principal diana de los axones excitadores. De este modo, se presume que los efectos psicomotores y motivacionales que se observan en individuos que se autoadministran drogas de abuso son debidos a los cambios plásticos inducidos en las células piramidales. En este estudio hemos investigado la posible alteración en la morfología de las células piramidales de un grupo de ratas que se autoadministran morfina. Las células piramidales fueron marcadas intracelularmente con Lucifer Yellow en la corteza cingulada de dos grupos experimentales: no tratados (CO) y tratados con morfina (MO). Hemos encontrado que las células piramidales en MO presentan más ramificaciones y más espinas que los controles. Como cada espina recibe al menos una sinapsis excitadora, diferencias en el número de espinas significa que existen diferencias en el número de aferencias excitadoras que integran

las neuronas piramidales de las ratas tratadas con morfina. Estos resultados sugieren que, en parte, los efectos negativos inducidos por la administración repetida de opiáceos pueden ser atribuidos a las alteraciones en las células piramidales.

O 61

EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA EN LOS GRUPOS NEURONALES DOPAMINÉRGICOS DEL CEREBRO DE PRIMATES

Sánchez-González MA, Cavada C

Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

El transportador de dopamina (DAT) recapta la dopamina desde el espacio extracelular a la neurona dopaminérgica, limitando la actividad postsináptica del neurotransmisor. El DAT parece estar implicado en procesos adictivos y neurotóxicos.

Hemos analizado la expresión de DAT en las poblaciones dopaminérgicas del cerebro de monos adultos *Macaca nemestrina* y *Macaca mulatta* mediante inmunofluorescencia doble para DAT y tirosina hidroxilasa (TH) e inmunohistoquímica para DAT y TH en cortes adyacentes.

En el tracto olfatorio lateral, corteza orbitofrontal medial y brazo vertical de la banda diagonal hay algunas neuronas DAT-positivas. No hay neuronas DAT-positivas en el estriado, región preóptica ni hipotálamo. Los grupos dopaminérgicos del mesencéfalo muestran, en conjunto, un intenso marcaje para DAT. Todas las neuronas de la «banda ventral» de la sustancia negra son fuertemente DAT-positivas, mientras que en la «banda dorsal» de la sustancia negra, así como en el área tegmental ventral, algunas neuronas TH-positivas no se marcan para DAT, o lo hacen débilmente. Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia gris periacueductal también muestran un patrón heterogéneo, con algunas neuronas intensamente inmunomarcadas para DAT y el resto con inmunorreactividad muy baja o nula.

Estos resultados sugieren que las estructuras diana de la innervación dopaminérgica presentan heterogeneidad, o quizá especialización, con respecto a la actividad de DAT.

Financiado por DGESIC PB98-0064 y DGI BFI 2002-00513

O 62

CONEXIONES CLAUSTROTALÁMICAS EN EL RATÓN: LA REGIÓN DEL SHELL COMO PRINCIPAL FUENTE DE EFERENCIAS HACIA EL TÁLAMO DORSAL

Matas E, Dávila JC, Guirado S, Real MA

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Universidad de Málaga

El claustró dorsal es una región telencefálica localizada profunda a la corteza insular. Las conexiones claustrócorcales han sido ampliamente estudiadas en diferentes especies de mamíferos, sin embargo las conexiones con el tálamo dorsal no han sido estudiadas con detalle. Hemos realizado inyecciones iontoforéticas con distintos trazadores neuronales en el claustró y tálamo dorsal del ratón. Nuestros resultados demuestran que existen conexiones recíprocas entre el claustró y núcleos intralaminares y de la línea media del tálamo, principalmente el paraventricular anterior, complejo mediodorsal, intermediodorsal, reuniens y centromedial. Las células claustrales que proyectan al tálamo se localizan fundamentalmente en la periferia del claustró, una región que hemos denominado *shell*, en toda su extensión rostrocaudal y bilateralmente. Tras inyecciones de BDA en núcleos del tálamo se observan axones que recorren principalmente la región periférica del claustró ipsilateral. Estos resultados se correlacionan con la expresión de dos proteínas ligadoras de calcio en el claustró dorsal del ratón (Real et al. 2003), en la que se definen dos regiones quimioarquitectónicamente diferentes: una región central o *core*, con un neuropilo fuertemente inmunorreactivo para la parvalbúmina, rodeada por una región

periférica o *shell* que se caracteriza por una densa innervación calretinina positiva y por la ausencia de parvalbúmina.

Financiado por BF12000-1359-C02-01 y FIS-01-0057-01.

Neurofarmacología

Moderador: E. Alborch

O 63

NICOTINA EN RATAS PRIVADAS DE ALCOHOL, INCREMENTA LA RECAÍDA Y ESCALADA DE AUTOADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL

López-Moreno JA^a, Trigo-Díaz JM^a, Rodríguez de Fonseca F^b, González-Cuevas G^a, Gómez de Heras R^a, Crespo-Galán I^a, Navarro M^a

^aDpto. de Psicobiología. Univ. Complutense de Madrid.

^bUnidad de Investigación. Fundación Hospital Carlos Haya. Málaga

Nicotina y alcohol son las drogas más consumidas por humanos. Existe una estrecha relación entre la dependencia de alcohol y el consumo de nicotina. Cerca del 90% de alcohólicos fuman cigarrillos. Las bases neurobiológicas de la comorbilidad entre ambas dependencias no está clara. En el presente trabajo hemos investigado, en un modelo animal, si la administración de nicotina es capaz de fomentar un consumo más intenso en animales con historial de autoadministración de etanol. 50 ratas macho Wistar, fueron entrenadas en presionar una palanca para obtener etanol (10% etanol/agua, 30 minutos/día, durante 5 días consecutivos, razón fija 1). Una vez conseguido el consumo estable de alcohol durante al menos tres semanas, se agruparon en grupos (n= 9-11) y se les privó de etanol durante los 5 días correspondientes. En este período, los animales pasaron por el paradigma de condicionamiento a lugar preferente (CLP) con nicotina (0,1, 0,2, 0,4 o 0,8 mg/kg SC), con cinco días de exposición a la nicotina (fase de condicionamiento). Otro grupo de animales fueron inyectados con salino, no recibieron nicotina y tampoco tuvieron acceso a etanol (grupo control). Posteriormente ambos grupos, retornaron a las cajas de AAd de etanol y se evaluó su consumo durante las 2 semanas siguientes.

Los resultados muestran que el consumo de etanol es mayor y mantenido en el tiempo (segunda semana), en los animales que han pasado una privación de etanol contingente con la exposición de nicotina. Este efecto es mayor con la dosis de 0,8 mg/kg de nicotina, (única dosis que provocó aversión en CLP).

Estos datos indicarían que la nicotina es un estímulo importante en la recaída en el consumo de etanol tras un periodo de privación de éste. Financiado por MCYT, Plan Nacional Sobre Drogas y Red RTA.

O 64

EL VALPROATO SUPRIME EL STATUS EPILEPTICUS INDUCIDO POR 4-AMINOPIRIDINA EN NEURONAS DE HIPOCAMPO

Martín ED, Pozo MA

Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid. Madrid

Se han investigado los efectos del valproato (VPA) en un modelo *in vivo* de *status epilepticus* (SE) inducido por la aplicación de 4-aminopiridina (4AP) en el hipocampo de rata. Para determinar los posibles mecanismos celulares involucrados, se registraron las neuronas piramidales de CA1 empleando técnicas de *patch clamp* (modalidad *whole cell*) en rodajas de hipocampo. *In vivo*, la aplicación de 4AP (100 mM) induce un SE en la región de CA1 que es suprimido rápidamente ($H > 100$ s) por la inyección intravenosa de VPA (400-600 mg/kg). Dosis menores de VPA (100-300 mg/kg) sólo son efectivas cuando se inyectan antes de inducir el SE. *In vitro*, la perfusión con VPA (500 μ M) disminuye la amplitud de las

corrientes excitatorias postsinápticas (EPSCs), provocadas por la estimulación de las colaterales de Schaffer, sin modificar las corrientes inhibitorias postsinápticas (IPSCs). Tanto la facilitación a pulsos pareados como la varianza de las EPSC no fueron afectadas significativamente por VPA, lo que indica que no actúa modificando la probabilidad de liberación del neurotransmisor y sugiriendo un mecanismo de acción postsináptico. Además, el VPA reduce significativamente el componente no NMDA de las EPSC sin afectar el componente NMDA. Tanto la frecuencia como la amplitud de las EPSCs espontáneas inducidas por 4AP disminuyó por la perfusión con VPA lo que evita la ulterior aparición de actividad epileptiforme. En conclusión, el VPA *in vivo* suprime el SE a dosis altas y lo previene a dosis relativamente bajas. *In vitro* disminuye la actividad sináptica excitadora a través de la modulación postsináptica de receptores no NMDA sin modificar la inhibición. Esta reducción de la excitación es, al menos en parte, responsable del efecto antiepileptico del VPA.

O 65

MODULACIÓN DE LA VÍA ERK/MAP-CINASAS POR FÁRMACOS μ , δ Y κ OPIOIDES EN CORTEZA FRONTAL DE RATA *IN VIVO*

Asensio VJ, Miralles A, García-Sevilla JA

Laboratorio de Neurofarmacología, Unidad Asociada del Instituto Cajal/CSIC, Departamento de Biología de la Universidad de las Islas Baleares. Palma de Mallorca

Estudios *in vitro* indican que la vía de las MAP-cinasas participa en los mecanismos de transducción de señal de los receptores opioides. El objetivo de este trabajo fue estudiar la modulación, a través de los receptores opioides, de las proteínas MEK1/2, ERK1/2 y sus formas fosforiladas (activas) p-MEK1/2 y p-ERK1/2 en corteza frontal de rata *in vivo*. La inmunorreactividad de las proteínas se determinó mediante Western-blot con anticuerpos específicos. Las densidades se expresan como porcentaje de control. Los tratamientos agudos (30 min) con los agonistas opioides selectivos μ , sufentanilo (15 μ g/kg, SC); δ , SNC80 (10 mg/kg, IP) y κ , U50.488-H (10 mg/kg, IP) incrementaron de manera significativa la densidad de p-MEK1/2 ($160 \pm 17\%$, $p < 0,05$; $160 \pm 15\%$, $p < 0,01$ y $162 \pm 15\%$, $p < 0,01$, respectivamente). Tratamientos agudos a 60 y 120 min con los agonistas opioides mostraron comportamientos temporales diferenciales de la inmunorreactividad de p-MEK1/2. Únicamente el tratamiento con SNC80 (30 min) incrementó la densidad de p-ERK1 ($126 \pm 5\%$, $p < 0,05$) y p-ERK2 ($142 \pm 6\%$, $p < 0,01$). Los efectos del SNC80 fueron bloqueados por el antagonista δ -opioides naltrindol (5 mg/kg, IP, 30 min del agonista). Los resultados indican que existe una activación de la vía de las MAP-cinasas por los receptores opioides, en particular por los receptores δ , en corteza frontal de rata *in vivo*.

Financiado por el MCT (BF12000-0306). V.J.A. becario FPU (MECD).

O 66

LA ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES ALFA1-ADRENÉRGICOS EN CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL DE RATA INCREMENTA LA LIBERACIÓN DE SEROTONINA *IN VIVO*. REVERSIÓN POR ANTIPSICÓTICOS

Amargós-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F

Departament de Neuroquímica, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS. Barcelona

Las neuronas piramidales de corteza prefrontal medial (CPFm) proyectan hacia las neuronas serotoninérgicas del mesencéfalo y controlan su actividad. La estimulación de los receptores 5-HT_{2A} en CPFm aumenta la frecuencia de descarga de las neuronas piramidales y serotoninérgicas, y la liberación de serotonina (5-HT) en CPFm. Esta área posee gran densidad de receptores alfa1-adrenérgicos, acoplados a PLC al igual que los 5-HT_{2A}, cuya activación aumenta la excitabilidad de las neuronas piramidales. Por esta razón hemos estudiado los efectos de su estimulación sobre la liberación in

vivo de 5-HT en CPFm de rata. La aplicación de cirazolina (agonista alfa1) en CPFm aumentó la liberación local de 5-HT, efecto antagonizado por TTX, prazosin (antagonista alfa1), BAYx 3702 (agonista 5-HT1A), NBQX (antagonista AMPA/KA) y 1S,3S-ACPD (agonista mGluR II/III), y no por MK-801 (antagonista NMDA). Cirazolina potenció la liberación de 5-HT inducida por DOI (agonista 5-HT2A/2C) y AMPA. M100907 (antagonista 5-HT2A) y no SB-242084 (antagonista 5-HT2C) revirtió la liberación de 5-HT inducida por cirazolina. Estos datos sugieren que la estimulación de receptores alfa1-adrenérgicos en CPFm activa las aferencias piramidales hacia las neuronas serotoninérgicas del rafe. Los antipsicóticos clásicos (clorpromazina, haloperidol) y atípicos (clozapina, olanzapina) reversion el efecto de cirazolina, sugiriendo que el antagonismo de los receptores alfa1-adrenérgicos en CPFm podría contribuir a su acción terapéutica.

O 67

EL PRETRATAMIENTO CON EBSELEN NO INDUCE NEUROPROTECCIÓN MANTENIDA EN RATAS SOMETIDAS A ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL GRAVE

Alborch E^{a,b}, Pérez-Asensio FJ^a, Burguete MC^a, Marín N^b, Pitarch C^c, Romero FJ^b, Torregrosa G^{a,b}, Salom JB^{a,b}

^aCentro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia. ^bDepartamento de Fisiología, Universidad de Valencia. ^cDepartamento de Medicina Preventiva y Salud Pública (Área de Bromatología y Nutrición), Universidad de Valencia

Los radicales libres de oxígeno están implicados en la fisiopatología de la isquemia cerebral, especialmente tras reperusión espontánea o trombolítica. El posible efecto neuroprotector de ebselen (10 y 100 mg/kg, oral), un mimético de la glutatión peroxidasa, se ha estudiado en un modelo que combina isquemia focal grave (2 h) y reperusión prolongada (7 días) en ratas. La isquemia se indujo mediante la técnica del filamento intraluminal, comprobando la perfusión cerebrocortical con una sonda láser-Doppler. El volumen de infarto se midió mediante tinción en fresco con cloruro de trifeniltetrazolio. El nivel de glutatión cerebral no se modificó tras la isquemia, pero se redujo significativamente ($p < 0,05$) en el hemisferio afectado tras 60 min de reperusión. La agresión isquémica produjo una tasa de mortalidad del 30% y las ratas supervivientes perdieron un 25% de peso corporal en una semana. El pretratamiento con ebselen incrementó significativamente ($p < 0,05$) la concentración de selenio plasmático, pero no modificó la reducción de glutatión cerebral provocada por la isquemia-reperusión. Los volúmenes de infarto fueron $26.8 \pm 4,7\%$ del hemisferio en ratas tratadas con placebo (aceite de oliva), $26.6 \pm 3,6\%$ con 10 mg/kg de ebselen y $25,6 \pm 6,4\%$ con 100 mg/kg. Los resultados indican que el pretratamiento oral monodosis con ebselen no reduce el tamaño del infarto provocado por una isquemia cerebral grave y agravado por la reperusión, tras una semana de evolución.

O 68

MODIFICACIONES EN LOS SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN Y EFECTORES IMPLICADOS EN LA SUPERSENSIBILIDAD ANALGÉSICA A OPIOIDES

Hurlé MA, Mostany R, Valdizán EM, Riancho V, Díaz A

Departamento de Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander

Existen dos modelos de supersensibilidad a la analgesia opiácea en ratas: a) tratamiento crónico con antagonistas opiáceos, y b) tratamiento crónico con agonistas opiáceos asociados a antagonistas del calcio. Hemos analizado en ambos modelos la activación de proteínas Gi/o y la actividad adenililciclase asociadas a receptores opiáceos mu. Para inducir supersensibilidad se administró durante 7 días: a) naltrexona (120 µg/h), y b) sufentanilo (2 µg/h) + nimodipino (1 µg/h). La activación de proteínas Gi/o se determinó mediante la fijación de [³⁵S]GTPγS tras la estimulación con el agonista opiáceo DAMGO (0.01-100 µM) en secciones de médula espinal. La actividad adenililciclase se determinó mediante la

capacidad del del opioide de inhibir la acumulación de APMc inducida por forskolina en homogeneizados de médula espinal. El tratamiento crónico con naltrexona produjo un aumento significativo en la fijación de [³⁵S]GTPγS en asta dorsal espinal (+23%), sin embargo el tratamiento combinado de sufentanilo y nimodipino redujo significativamente la fijación de [³⁵S]GTPγS (-22%). Ambos tratamientos aumentaron significativamente la capacidad del sufentanilo de inhibir la acumulación de APMc ($E_{max} = 21,6\%$; $32,3\%$ y $45,6\%$, para el control, la naltrexona y el sufentanilo más nimodipino, respectivamente). Se discuten los posibles mecanismos implicados en la supersensibilidad opiácea. Financiado por: F. Valdecilla (02/A18) e Instituto Salud Carlos III (G03/005).

O 69

EL FK506 PROMUEVE LA REINNervACIÓN POR REGENERACIÓN Y POR RAMIFICACIÓN COLATERAL DE FIBRAS NERVIOSAS PERIFÉRICAS

Udina E, Ceballos D, Navarro X

Grupo de Neuroplasticidad y Regeneración, Instituto de Neurociencias y Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universitat Autònoma de Barcelona

Hemos examinado los efectos de la administración de dos dosis de FK506 (0,2 y 5 mg/kg día) en el grado de reinnervación alcanzado mediante la regeneración (después del aplastamiento del nervio ciático) y de la ramificación colateral del nervio safeno intacto (después de la resección del nervio ciático) en el ratón. Mediante técnicas no invasivas se evaluó la recuperación funcional a lo largo de un mes, después del cual se realizó un análisis morfométrico del nervio regenerado y un estudio inmunohistoquímico de la piel plantar. En el modelo de aplastamiento del nervio ciático, la administración de FK506 acorta el tiempo de reinnervación de los órganos diana e incrementa el grado de reinnervación funcional y morfológica alcanzado. En el modelo de ramificación colateral, el FK506 promueve la reinnervación de los axones nociceptivos y sudomotores y el territorio de expansión siguió una evolución más rápida entre los días 4 y 14. Aunque las dos dosis de FK506 (0,2 y 5 mg/kg) potencian de manera similar la arborización colateral de los axones nociceptivos, la de los axones simpáticos es más marcada en los animales tratados con dosis más altas. Estos datos sugieren que el efecto del FK506 es diferente dependiendo del tipo de neurona sobre la que actúen. Podemos concluir que el FK506 no sólo promueve la tasa de elongación axonal sino que también incrementa la recuperación funcional de los órganos diana denervados mediante la potenciación de la regeneración y la ramificación colateral

O 70

EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE MODIFICA EL PROGRAMA DE DIFERENCIACIÓN DE PRECURSORES NEURALES INHIBIENDO LA NEUROGÉNESIS Y FAVORECIENDO LA GLIOGÉNESIS

Aguado T^a, Rueda D^a, Navarro B^b, Martínez-Serrano A^b, Guzmán M^a, Galve-Roperh I^a

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Biología, Universidad Complutense. Madrid. ^bCentro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma. Madrid

Los cannabinoides participan en el control del destino celular del sistema nervioso. Así, los cannabinoides protegen de apoptosis a neuronas y astrocitos, pero inducen apoptosis en células de glioma. Sin embargo, se desconoce el posible papel del sistema endocannabinoide en la generación de los distintos linajes celulares del sistema nervioso. Para ello se emplearon neuroesferas obtenidas de cultivos no adherentes de precursores neurales multipotentes (nestina+), observándose que estas células, al igual que los precursores neurales adherentes, expresan el receptor de cannabinoides CB1. El tratamiento con cannabinoides de los precursores

corticales durante el proceso de diferenciación *in vitro* inhibe la generación de neuronas maduras en un proceso mediado por el receptor CB1 y asociado a la disminución de la expresión de marcadores neuronales $\hat{\alpha}$ -tubulina III y Neu N. De modo similar, experimentos de inmunocitoquímica revelan que los cannabinoides favorecen la diferenciación a fenotipo astrogial (GFAP+) y un descenso en la población neuronal ($\hat{\alpha}$ -tubulina III+). La acción de los cannabinoides parece influir sobre el programa de diferenciación celular ya que no se observó una disminución en la viabilidad de los precursores neurales. Experimentos *in vivo*, realizados en animales adultos para determinar el efecto de los cannabinoides en la neurogénesis posnatal, evidenciaron así mismo una reducción significativa de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo tras el tratamiento con cannabinoides. En resumen, el sistema endocannabinoide podría constituir un nuevo sistema de señalización endógeno implicado en la regulación de la génesis de los distintos linajes celulares del sistema nervioso a partir de precursores multipotentes.

Membranas excitables y segundos mensajeros

Moderadores: J. Satrustegui y M.T. Pérez

O 71

LOCALIZACIÓN DENDRÍTICA DE LA CORRIENTE LENTA DE POTASIO ACTIVADA POR CALCIO EN NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DE HIPOCAMPO DE RATA

Cabezas C^a, Sánchez-Jiménez A^a, Borde M^b, Buño W^a

^a Instituto Cajal, CSIC, Madrid. ^b Neurofisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay

La sIAHP es una corriente activada por el aumento de calcio citosólico, que sigue a potenciales de acción. Su activación disminuye la excitabilidad celular, aumenta la adaptación, y regula el calcio intracelular. Su localización subcelular podría ser de gran importancia en el control del flujo de señales eléctricas.

Utilizando rodajas de hipocampo de rata, y registros de neuronas piramidales de CA1 en un medio libre de calcio, aplicando calcio (2 mM) con una micropipeta con pulsos de presión en distintas zonas de la neurona analizamos la localización subcelular de la sIAHP.

Hemos encontrado que:

- 1) La sIAHP es mayor a 30 micras del soma en la dendrita apical y decae con una pendiente de 46%/micra hacia regiones más distales.
- 2) La sIAHP está asociada a canales de calcio tipo L, y su perfil depende de la localización de éstos, ya que varía aplicando nifedipina.
- 3) El perfil de la sIAHP depende de la liberación de calcio de los reservorios intracelulares, ya que se modifica con rianodina.

En conclusión, la sIAHP se localiza principalmente en la dendrita apical con un máximo de activación a 30 micras del soma. Esta situación resulta de la combinación de la localización de los canales de potasio, de calcio tipo L y de la compartimentalización de los reservorios de calcio. Por su localización podría regular las entradas sinápticas dendríticas y controlar la propagación retrógrada de potenciales de acción.

Financiado por DGICYT, MEC (PM980113) y MCYT (BF12002-01107).

O 72

EFFECTO DE DISTINTOS INHIBIDORES DE LA CORRIENTE M EN LA ADAPTACIÓN DE LAS NEURONAS SIMPÁTICAS DE RATÓN EN CULTIVO

Romero M, Reboreda A, Sánchez E, Lamas JA

Área de Fisiología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Vigo

La corriente M es importante en el mantenimiento del potencial de reposo y en los fenómenos de adaptación de varios tipos celulares. Con el uso de la técnica de *patch*-perforado hemos investigado la efectividad

de varios inhibidores sobre la corriente M y la adaptación en células del ganglio cervical superior de ratón en cultivo.

Las curvas dosis-respuesta muestran que los bloqueantes bario, linopirdine y XE991 son capaces de inhibir el 100 % de la corriente. Sin embargo, el agonista muscarínico Oxo-M provoca una inhibición máxima del 60 %. El bario 1 mM y la Oxo-M 10 μ M producen una despolarización del potencial de membrana de unos 10 mV e inhiben la adaptación, aunque el efecto de la Oxo-M no es significativo en todas las intensidades de corriente inyectadas. Sin embargo, la linopirdine 10 μ M y la XE991 3 μ M, provocan una despolarización de tan sólo unos 2 mV y no afectan la adaptación.

En experimentos de fijación de voltaje la Oxo-M y el bario inhiben la corriente M a cualquier voltaje. Sin embargo, la linopirdine y la XE991 son ineficaces a voltajes cercanos al reposo ($H \geq 60$ mV); ambos requieren la despolarización de la membrana para inhibir la corriente M, y dicha inhibición se desarrolla con una constante de tiempo de 39 s y 56 s respectivamente. La inhibición de la corriente M producida por la linopirdine es directamente proporcional a la despolarización de la membrana, indicando que esta droga es un inhibidor voltaje-dependiente. Nuestros resultados demuestran que la acción de los nuevos inhibidores de la corriente M (linopirdine y XE991) es más compleja que la del bario y la Oxo-M, ya que requieren de una despolarización previa de la membrana. Proyecto financiado por la DGESIC (PB98-1087).

O 73

REGISTRO ELÉCTRICO DE LA MUERTE NEURONAL: GLÍA, ATP Y DEPRESIÓN DE LEÑO

López-Aguado L^a, Canals S^a, Pastor J^a, Menéndez de la Prida L^a, Delgado-Wallace M^b, Herreras O^a

^a Dpt. Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

^b Itto. Pluridisciplinar, U. Complutense, Madrid

Períodos de escasez energética durante anoxia/isquemia causan la inactivación y muerte de las neuronas. Las vías, los responsables y los tiempos varían con el tipo y duración de la lesión. Aquí describimos la secuencia de eventos durante la pérdida de electrogénesis, marcador de muerte en células excitables, hasta la ruptura física de membrana. Por su especificidad y similitud con la penumbra isquémica utilizamos nuestro modelo de fallo metabólico glial selectivo causado por fluoroacetato (Largo et al. J Neurosci 1006; 16: 1219) en la región CA1 *in vitro* (agudo y organotípico). Realizamos registros de campo e intracelulares, medida de resistividad tisular, test de integridad física de membrana e identificación inmunohistoquímica de tipos celulares. Los resultados muestran hinchazón glial y disfunción homeostática previos al deterioro eléctrico o morfológico neuronal. Luego, las neuronas caen en un estado eléctrico «gliode», con hiperpolarización e inhabilitación gradual de canales activados por voltaje y ligando, seguido de ruptura de membrana. La pérdida electrogénica es causada por disminución interna de ATP, a su vez promovida por disfunción glial previa. La ocurrencia de ondas de Leño, iniciadas por alteraciones ambientales, precipita la muerte neuronal. En sí mismas, las alteraciones ambientales hasta ahora consideradas críticas en muerte isquémica, parecen tener un papel menor en la muerte neuronal. Financiado por PB98/1639 y BEFI02/1767.

O 74

EXPRESIÓN DE MÚLTIPLES TIPOS DE CANALES DE CALCIO EN CÉLULAS CROMAFINES

Benavides A, Calvo S, González-García C, Ceña V

Centro Regional de Investigaciones Biomédicas,

Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) juegan un papel esencial en multitud de funciones celulares en células cromafines: mantenimiento de la homeostasis, secreción de catecolaminas... Estudios

farmacológicos y electrofisiológicos han demostrado la existencia de diferentes tipos de CCDV de alto umbral (tipo L, N, P/Q); sin embargo, existen muy pocos datos acerca de los tipos de subunidades alfa 1 que componen dichos canales. Nuestros estudios de RT-PCR demuestran que las células cromafines expresan todos los tipos de subunidades alfa 1 de CCDV de alto umbral descritos en la actualidad: alfa 1C, alfa 1D y alfa 1S (que forman canales de tipo L), alfa 1B (canales tipo N), alfa 1A (canales tipo P/Q) y alfa 1E (canales tipo R). El análisis comparativo de los niveles de expresión de las diferentes subunidades alfa 1 demuestra que el patrón de expresión de las diferentes subunidades en la médula adrenal intacta no se conserva en las células cromafines en cultivo, observándose un aumento en los niveles de las subunidades alfa 1A y alfa 1B en células cromafines en cultivo y una disminución del resto de las subunidades.

Financiado, en parte, por los proyectos SAF99-0060 from CICYT, BFI2001-1565 del MCYT; G03/167 M. de Sanidad, GC-02-019 and PAI-02-031 de Consejería de Ciencia y Tecnología, JCCM y por la Fundación Campollano-Banco Santander Central Hispano a V.C., BFI2001-1058 de MCYT, GC02-029 de la Consejería de Sanidad JCCM a C.G.G. y SAF2001-0760 de CICYT a S.C. AB es becaria CRIB de la JCCM.

O 75

DREAM CONTRIBUTES TO PINEAL CIRCADIAN RHYTHMS

Ledo F, Link WA, Torres B, Madsen T, Albar JP, Mellstrom B, Naranjo JR

Dpto. Biología Molecular y Celular, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Madrid

The molecular mechanisms controlling the oscillatory synthesis of melatonin in rat pineal gland involve the rhythmic expression of several genes including AA-NAT, ICER and fra-2. Here we show that transcriptional repressor DREAM binds to DRE sites located in the regulatory regions of these genes and represses basal and induced transcription from ICER, fra-2 or AA-NAT promoters. Importantly, we demonstrate that the DREAM binding activity to DRE sites shows day/night oscillations in rat pineal gland, retina and suprachiasmatic nucleus but not in the cerebellum. The peak for DREAM binding activity occurs during the day period of the circadian cycle coinciding with the lowest levels of fra-2, ICER and AA-NAT transcripts. Interestingly, we show that the rapid clearance of DRE binding activity during entry in the night period is related to processing of the DREAM protein. The circadian pattern of DREAM is maintained under constant darkness indicating that an endogenous clock is controlling DREAM function. Our data suggest the involvement of DREAM in the regulation of rhythmically expressed genes engaged in circadian rhythms.

O 76

LA ACTIVACIÓN POR CALCIO EXTRAMITOCONDRIAL DE LA LANZADERA DE NADH MALATO-ASPARTATO TIENE UN POSIBLE SIGNIFICADO FISIOLÓGICO EN CEREBRO

Contreras L^a, Pardo B^a, Del Arco A^b, Satrustegui J^a

^aDepartamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid. ^bFacultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidad de Castilla La Mancha. Toledo

La lanzadera de NADH aspartato-malato (lanz asp-mal) está regulada por la reacción del transportador mitocondrial de aspartato-glutamato (AGC), representado por los genes aralar1 y citrina. Las proteínas correspondientes tienen motivos de unión de calcio localizados hacia la cara externa de la membrana mitocondrial interna y el transporte de glutamato catalizado por el AGC se activa por calcio extramitocondrial. Por lo tanto, el AGC puede conferir sensibilidad por calcio extramitocondrial a la entrada de equivalentes de reducción mediada por la lanz asp-mal.

Para investigar esta posibilidad, se ha estudiado la activación por calcio extramitocondrial de la lanz asp-mal reconstituida en mitocondrias de cerebro (donde aralar1 es la única AGC) e hígado (donde citrina es la única AGC). Se encontró que en el cerebro, la actividad de la lanzadera se estimulaba por calcio al rededor de 3-4 veces, con una $S_{0.5}$ de $324 \pm 114,9$ nM, es decir, a concentraciones más bajas de las que promueven la entrada de calcio por el uniportador de calcio, el único mecanismo conocido para la señalización mitocondrial de calcio. Sin embargo, en hígado la lanzadera tenía una actividad insensible a calcio, excluyendo un papel para citrina en la transducción de la señal de calcio a la mitocondria hepática. Estos resultados indican que aralar1 y la lanz asp-mal de cerebro constituyen un sistema para la transducción de la señal de calcio a la mitocondria que puede ser importante para señales pequeñas y/o globales de calcio.

O 77

EL PAPEL DE LAS VÍAS PI3K-AKT Y ERK QUINASA EN LA SUPERVIVENCIA POR NMDA EN LA MUERTE APOPTÓTICA PROVOCADA POR K5 EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA. PREDOMINANCIA Y REGULACIÓN

Xifró X^{a,b}, Falluel A^a, Malagelada C^b, Miñano AJ^b, Vaudry D^a, Vaudry H^a, Gonzalez B^a, Rodríguez-Álvarez J^b

^aLab. Neuroendocrinol. Cell. Mol., INSERM U413, UA CNRS, IFRMP 23, Univ. Rouen. Mont Saint-Aignan, France. ^bDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España

Las neuronas granulares de cerebelo (CGCs), en cultivo mueren por apoptosis en un medio con 5 mM de KCl (K5), pero sobreviven si se cultivan con concentraciones despolarizantes de KCl (25 mM o K25) o diversos factores extracelulares. *In vivo* estas neuronas requieren de la aportación continua de *inputs* excitatorios para sobrevivir. Para simular esta situación *in vitro*, tratamos las neuronas al 2.º día *in vitro* (2DIV) cuando aún son inmaduras con K25 y NMDA que simularían los *inputs* excitatorios. K25 y NMDA son capaces de fosforilar Akt así como ERK 1,2. La inhibición de la PI3K con wortmanina bloquea el efecto protector de ambos estímulos así como la inhibición de la actividad caspasa-3 por K25 y NMDA. Por otro lado la inhibición de la vía de las ERK 1,2 a nivel de MEK bloquea sólo el efecto neuroprotector y la inhibición de la caspasa-3 por K25. Inhibiendo MEK observamos cómo se produce una inhibición de la fosforilación de Akt en presencia de K25 pero no en presencia de NMDA. Lo mismo ocurre inhibiendo la PI3K y viendo qué ocurre en la fosforilación de ERK 1,2. Estos datos parecen indicar una conexión entre las vías PI3K-Akt y ERK 1,2 en la neuroprotección por K25 pero no en la neuroprotección por NMDA. Hemos observado también que NMDA y K25 son capaces de estimular la proteína G monomérica Ras pero con cinéticas diferentes. Este dato, así como que Ras es capaz de activar directamente ambas vías, sugiere un papel predominante de esta proteína en la regulación de las dos vías.

O 78

LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS PI3K-AKT Y ERK QUINASA NO SON SUFICIENTES PARA QUE EL 17-BETA-ESTRADIOL EJERZA UN EFECTO NEUROPROTECTOR FRENTE A LA MUERTE APOPTÓTICA POR DEPRIVACIÓN DE POTASIO EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO

Miñano AJ^a, Cerbón MA^{a,b}, Xifró X^a, Malagelada C^a, Rodríguez-Álvarez J^a

^aInstitut de Neurociències, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona, España.

^bFacultad de Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México DF.

El 17-beta-estradiol (E2) protege de la muerte apoptótica en múltiples sistemas a través de diferentes mecanismos. El E2 puede activar diferentes vías de transducción de señales a través de la transactivación del receptor *insulin-like growth factor-1* (IGF-IR). En el modelo de apoptosis en

neuronas granulares de cerebelo (CGCs) por privación de potasio, el IGF-I es un buen neuroprotector induciendo la activación de las vías Ras-MAPK y PI3K-Akt. Las neuronas granulares presentan los receptores de estrógenos y contrariamente el E2 no protege frente a la apoptosis en este mismo modelo, no mostrando el cultivo de neuronas una diferencia de viabilidad significativa. Los niveles de activación de las actividades ERK 1,2 y Akt resultaron ser similares a los observados por el estímulo con IGF-I, mostrando una cinética comparable en ambos casos. Nuestros datos indican que el E2 no protege frente a la muerte apoptótica en CGCs por un mecanismo asociado al estímulo de las actividades ERK 1,2 y Akt a pesar de ser suficientes y necesarias las activaciones de estas quinasas para observar un efecto neuroprotector por el IGF-I. Posiblemente en nuestro modelo no es suficiente la activación de las vías PI3K-Akt y ERK para observar un efecto neuroprotector por el E2.

Desarrollo y plasticidad

Moderadores: R. Soler y F. Giráldez

O 79

MODIFICACIONES DE AMINOÁCIDOS Y ZINC TOTAL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA DURANTE EL DESARROLLO

Lima L^a, Obregón F^a, Quintal M^b, Roussó T^a, Benzo Z^b, Auladell C^c

^aLaboratorio de Neuroquímica. ^bCentro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela. ^cDepartament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Barcelona, España

La deficiencia de zinc y de taurina ocasiona malformaciones y disfunciones del sistema nervioso central. Ratas Sprague-Dawley fueron usadas en los periodos posnatales (P) 5, 10, 15, 20, 30 y 50 días. Mediante disección se obtuvieron la retina, el hipocampo y el giro dentado. La taurina y su precursor, la hipotaurina, se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución con detector fluorescente, y el zinc total por espectrometría ICP. Los niveles de taurina y de hipotaurina descendieron en el hipocampo y se mantuvieron en el giro dentado durante el desarrollo ontogénico. Sin embargo, la taurina y la hipotaurina se incrementaron en la retina hasta P30. Ambos aminoácidos disminuyeron en las ratas de P50. Taurina y zinc presentaron una correlación positiva y significativa en el hipocampo para P30, ésta fue negativa en relación a la hipotaurina y al zinc. La correlación entre taurina e hipotaurina fue positiva principalmente a P50. La capacidad oxidativa necesaria para la formación de taurina se modifica con la edad. La relación de estos aminoácidos con el zinc total sólo se observó en la rata adulta. La constancia de los niveles de taurina e hipotaurina en el giro dentado podría tener influencia en la capacidad proliferativa de esta región del cerebro.

Financiación: FONACIT-2001-903, AECI02.

O 80

EXPRESIÓN DE TIROSINA HIDROXILASA EN CÉLULAS HUMANAS DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCONEURALES DE CÓRTEX CEREBRAL

Paño CL, Serrano AB, Bazán E

Servicio de Neurobiología-Investigación, Hospital Ramón y Cajal. Madrid

Hemos estudiado si es posible producir células catecolaminérgicas a partir de agregados de células proliferativas («neuroesferas») procedentes de cultivo de córtex cerebral fetal humano. Las neuroesferas, que habían sido expandidas durante más de 18 meses en medio definido suplementado con EGF, FGF-2 y LIF, producían neuronas (β -tubulina III+), astrocitos (GFAP+) y oligodendrocitos (GalC+) tras su siembra sobre sustrato adherente y retirada de los factores tróficos (r.f.t.), lo cual confirma su carácter de células tronco neurales. A los 3, 7 o 10 días tras la r.f.t,

aplicamos a las células humanas el mismo tratamiento inductor que produce células con fenotipo tirosina hidroxilasa positivo (TH+) en cultivos derivados de neuroesferas estriatales de rata, es decir, 1 mM dBcAMP, 0,1 μ M TPA y 10 ng/ml FGF-2. En todos los tiempos post-r.f.t. se observaron células TH+ tras un tratamiento inductor de 24 hr. El tratamiento inductor que se aplicó a los 7 días post-r.f.t. obtuvo el mayor rendimiento, con expresión del fenotipo TH+ en un 10-20% de las células. En los cultivos no tratados también se observó expresión espontánea de TH a partir del día 10 post-r.f.t., pero en ningún momento superó el 2% del total de células. El fenotipo TH+ se mantuvo durante largos periodos cambiando el medio de cultivo por Neurobasal suplementado con B27 (Gibco) tras las 24h de tratamiento inductor. Estos resultados sugieren que la corteza cerebral fetal humana puede producir células catecolaminérgicas en cultivo. Las células tronco neurales obtenidas de corteza cerebral podrían, entonces, utilizarse como fuente perdurable de células dopaminérgicas humanas. Financiado por FIS PI020853.

O 82

PROGRAMAS NEUROGENÉTICOS EN ÁREAS MESENCÉFÁLICAS Y METENCEFÁLICAS: RELACION CON LA PÉRDIDA NEURONAL EN EL MUTANTE WEAVER

Martí-Clúa J, Santa-Cruz MC, Martín-Pérez V, Hervás JP

Unidad Citología e Histología, Universidad Autónoma de Barcelona

Los ratones homocigóticos para el gen *Weaver* se utilizan como modelo experimental para el estudio de la génesis, desarrollo y muerte neuronal, dado que presentan una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y de neuronas de Purkinje en el córtex cerebeloso. Con el fin de determinar si la disminución de estos dos tipos neuronales se relaciona con su neurogénesis, animales control y homocigóticos *Weaver* fueron obtenidos por cruzamiento entre ratones heterocigóticos. Las hembras preñadas se inyectaron con timidina tritiada y sus descendientes se perfundieron a los 90 días de edad. Tras el procesamiento histológico, las neuronas dopaminérgicas se detectaron mediante inmunohistoquímica, utilizando técnicas autorradiográficas para estimar la duración de la neurogénesis en ambas poblaciones de neuronas. Los resultados obtenidos al comparar ambos genotipos muestran diferencias evidentes del programa neurogenético de las neuronas dopaminérgicas, mientras que tanto el comienzo y duración de la neurogénesis como el patrón de generación neuronal fue similar para las células de Purkinje. Paralelamente, la pérdida de neuronas de Purkinje en los ratones *Weaver* dependió del compartimiento del córtex cerebeloso estudiado (gradiente medio-lateral). Finalmente, nuestros datos también muestran que la reducción en el número de células dopaminérgicas se relaciona con sus perfiles neurogenéticos. En este caso, las neuronas ausentes son principalmente las de generación tardía.

O 83

ALTERACIONES DE LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS EN DISPLASIA CORTICAL E IMPLICACIONES EN EPILEPSIA

Alonso-Nanclares L, DeFelipe J

Departamento de Neuroanatomía y Biología Celular, Instituto Cajal (CSIC). Madrid

La displasia cortical focal es una malformación originada durante el desarrollo del neocórtex y está frecuentemente asociada a la epilepsia. Existen diversos tipos de displasias corticales, que en general se caracterizan por la presencia de anomalías en la arquitectura laminar, neuronas alteradas, células baloniformes y neuronas ectópicas en sustancia blanca. El objetivo de este estudio es determinar qué alteraciones tienen lugar en los circuitos sinápticos. Para ello hemos analizado tejido cortical humano procedente de pacientes epilépticos. El tejido fue analizado mediante un método de correlación óptico-electrónico. Los pacientes examinados mostraron una gran variedad de alteraciones en la citoarquitectura del neocórtex. El análisis cuantitativo ultraestructural

reveló que la densidad sináptica por volumen estaba alterada en el tejido displásico, respecto al tejido normal. Estas alteraciones incluyeron incrementos o reducciones en las densidades sinápticas, y cambios en las proporciones de sinapsis excitadoras e inhibitoras. Sin embargo, estos cambios no mostraron un patrón común. Se encontraron además numerosas prolongaciones gliales en el neuropilo y sobre la superficie de algunos somas neuronales. Proponemos que la actividad epileptiforme proviene de las regiones aparentemente más normales.

Financiación: MCYT (L. A.-N., FP2000-4989 y DGCYT PM99-0105).

O 84

FUNCIONES DE Nogo Y NgR DURANTE EL DESARROLLO Y LA REGENERACIÓN DE LAS CONEXIONES CORTICALES

Mingorance A, Fontana X, Solé M, Soriano E, Del Río JA

Neurobiología del Desarrollo y Regeneración, Parque Científico de Barcelona-Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona, Universidad de Barcelona. Barcelona

Desde hace bastantes años se conoce que la mielina del SNC presenta un conjunto de moléculas con capacidad inhibitoria del crecimiento y la regeneración axonal. Entre ellas destacan los miembros de la familia Nogo (Nogo-A/B/C). Recientemente se ha descrito que NgR es el receptor de Nogo-A/B/C y que interactúa con P75 para poder transducir la señal inhibitoria al interior celular. Estudios preliminares han indicado que miembros de la familia Nogo y su NgR se expresan durante el periodo postnatal en la corteza cerebral. No obstante, se desconocen cuales pueden ser sus funciones durante el desarrollo y su posible regulación tras lesión de las conexiones corticales. Con estos objetivos, hemos analizado la expresión de Nogo-A y su receptor durante la ontogenia de la formación hipocámpica, así como su regulación en dos condiciones fisiológicas diferentes: la axotomía de la proyección entorrino-hipocámpica (EHP) y la hiperexcitabilidad inducida por kainato. Los resultados indican que Nogo y NgR están implicados en el establecimiento y estabilización de las conexiones corticales, ya que la ontogenia y el patrón de expresión de NgR es paralela a la maduración de los circuitos del hipocampo. Nogo y su receptor se expresan en el adulto en neuronas principales e interneuronas de la formación hipocámpica, así como en oligodendrocitos. Por otra parte, hemos observado que Nogo/NgR presentan procesos de sobreexpresión transitoria después de la axotomía de la EHP en neuronas principales y células gliales que pueden ayudar a entender los procesos de sprouting que acontecen después de la axotomía. No obstante, nuestros estudios de bloqueo in vitro indican que Nogo/NgR no juegan un papel fundamental en la ausencia de regeneración observada tras la lesión del EHP. Por último, la inyección intraperitoneal de kainato induce una regulación transitoria a la baja de los niveles de Nogo/NgR en el hipocampo. El conjunto de los resultados nos indican que Nogo y su receptor cumplen funciones durante el desarrollo y en modelos de lesión adicionales a la asumida inhibición al crecimiento axonal.

Financiado por: FIS01-0895, EET2003-05149 y SAF2001-3290

O 85

THE PROLIFERATIVE CENTERS OF THE LARVAL OPTIC LOBE OF *DROSOPHILA*: AN EXPERIMENTAL MODEL FOR THE MOLECULAR BASES OF NEURAL PROGENITOR CELLS

Tejedor FJ^a, Colonques J^a, Ceron J^a, Giangrande A^b

^a Instituto de Neurociencias, CSIC y UMH. Alicante, España.

^b IGBMC. Strasbourg, France

One of the most relevant problems in Neurobiology is to understand the mechanisms underlying the generation of cellular diversity in the brain. The embryonic nervous system of *Drosophila* has provided wide information on the processes of segregation of neural progenitor cells and their specification. However, morphological and cellular differences are very clear between the embryonic CNS of *Drosophila* and vertebrates.

For instance, neuralization and the pattern of division of embryonic neuroblasts (NBs) are very different from that of neuroepithelial progenitors in vertebrates. In order to explore an alternative experimental model where to study the genetic and molecular basis of the proliferation and specification of CNS progenitors, we are studying the proliferative centers of the larval optic lobes of *Drosophila* from which most cells of the adult brain originate. We focus our attention on several aspects of these processes: the pattern of cellular division, the switch from symmetric to asymmetric divisions, the expression/localization of asymmetric cell fate determinants that may be involved in the specification of neural cells, and the genetic analysis of genes which may regulate these processes. We are studying two genes, *Minibrain (Mnb)* and *glial cells missing (gcm/glide)*, which are involved in the generation of neurons and glia, respectively. Our results show interesting similarities between larval NBs and vertebrate neuroepithelial progenitors.

O 117

MECANISMOS CELULARES Y SINÁPTICOS RESPONSABLES DE LA GENERACIÓN DE ACTIVIDAD EPILEPTIFORME EN EL SUBÍCULO AISLADO IN VITRO

Menendez de la Prida L

Dpto. Neurobiología-Investigación, Hospital Ramón y Cajal. Madrid

El subículo proporciona una importante vía de proyección del hipocampo, recibiendo a su vez inervación desde distintas regiones corticales y subcorticales. Los principales tipos celulares del subículo incluyen: células glutamatérgicas de descarga intrínseca (células IB) y de disparo regular (células RS) e interneuronas gabérgicas de disparo rápido (células FS). A pesar que el subículo parece jugar un importante papel en la epilepsia humana, la participación de estos tipos celulares permanece aún oscura. En este trabajo se discuten los mecanismos celulares y sinápticos que hacen del subículo una región especialmente susceptible en la epilepsia del lóbulo temporal. Utilizando registros *patch-clamp* en las configuraciones *cell-attached* y *whole-cell* se caracterizaron los patrones de respuesta de los diferentes tipos celulares ante estimulación sináptica local. Se encontraron diferencias significativas entre la proporción de células IB (>50%) y RS (<20%) que son activadas sinápticamente. La mayoría de las interneuronas FS (>70%) fueron activadas de manera local por las células principales, generando una inhibición recurrente capaz de controlar el disparo de las células IB. Se analizaron estadísticamente los diferentes patrones de disparo en condiciones normales y de desinhibición. Los resultados muestran un papel esencial de la inhibición recurrente en el control de la hiperexcitabilidad a través de las células IB y un papel iniciador de éstas de la actividad epileptiforme.

Mecanismos de señalización

Moderadores: J. Rodríguez y A. Planas

O 86

LA ACTIVACIÓN SELECTIVA Y PESISTENTE DE ERK-1/2 POR ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS GLIALES INDUCE DEGENERACIÓN NEURONAL EN CULTIVOS PRIMARIOS DE MESENCÉFALO DEPLECIONADOS DE GLUTATIÓN

Canals S, Casarejos MJ, de Bernardo S, Solano RM, Mena MA

Departamento de Investigación, Servicio de Neurobiología, Hospital Ramón y Cajal. Madrid

Los niveles intracelulares de glutatión (GSH) determinan si el óxido nítrico (NO) tiene un efecto neurotrófico para las neuronas dopaminérgicas

o neurotóxico, en cultivos primarios de mesencéfalo. En este trabajo hemos estudiado la participación de las quinasas ERK-1/2 en el efecto del GSH sobre la función del NO. El donador de NO DEA/NO induce una activación transitoria de ERK-1/2, que desaparece totalmente 2 h después del tratamiento con NO. La depleción intracelular de GSH incrementa el pico de activación de ERK-1/2 en respuesta al NO y modifica la cinética de fosforilación, dando lugar a una segunda fase de activación que se prolonga 16 h tras el tratamiento. Este cambio de cinética es el último responsable de la toxicidad del NO en condiciones de depleción de GSH, puesto que el bloqueo selectivo de dicha fase persistente de activación, previene la muerte celular, y la simple activación transitoria de ERK-1/2 inducida por NO, no produce toxicidad. Mediante estudios inmunocitoquímicos de colocalización y el empleo de gliotoxinas, hemos demostrado que la activación de ERK-1/2 en respuesta a NO tiene lugar exclusivamente en células gliales. Nuestros resultados demuestran que con la depleción de GSH, el neurotrofismo del NO se transforma en neurotoxicidad, debido a la activación persistente de la ruta de señalización ERK-1/2 en las células gliales. Estas observaciones podrían ser relevantes en situaciones patológicas como la enfermedad de Parkinson, donde se ha documentado un incremento en la producción de NO junto con la depleción de GSH.

O 87

EL BLOQUEO DE MUERTE CELULAR MEDIADO POR BCL-XL INCREMENTA LA GENERACIÓN DE NEURONAS HUMANAS TIROSINA HIDROXILASA-POSITIVAS, A PARTIR DE NEURAL STEM CELLS

Liste I, Navarro B, Bueno C, Villa A, Martínez-Serrano A
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid

El estrés oxidativo es un conocido factor de riesgo y de muerte celular para las neuronas dopaminérgicas (DA). La sobreexpresión de tirosina hidroxilasa (TH) en células madre troncales humanas, o *neural stem cells* (hNSCs), fue incrementada (aprox. 2 veces) por factores neurotróficos (BDNF y GDNF) y antioxidantes, (enzima Superóxido Dismutasa; SOD1cit). Un compuesto antiapoptótico, como Bcl-XL, indujo una protección mucho mayor de las hNSCs TH+. La neuroprotección mediada por Bcl-XL fue específica de la expresión de TH, ya que no incrementó la expresión de lacZ, y su efecto es mimetizado por el inhibidor de pancaspasas ZVAD-fmk, lo que confirma el bloqueo del mecanismo apoptótico. Bcl-XL también aumentó (en 1-2 órdenes de magnitud) la capacidad de diferenciación dopaminérgica espontánea de líneas celulares de hNSCs inmortalizadas, Nurr-1+, y de cultivos de neuroesferas humanas. La producción de neuronas TH+ por la sobreexpresión de Bcl-XL en clones de hNSCs y en neuroesferas humanas, fue incluso mayor a la obtenida a partir de mesencéfalo ventral humano. Bcl-XL también aumentó la generación de neuronas por hNSCs, aunque en menor medida. Estos resultados sugieren: a) Un efecto específico de supervivencia sobre las neuronas dopaminérgicas, de Bcl-XL; b) El incremento de la expresión de Bcl-XL, puede tener una aplicación directa en la generación de una fuente continuada de neuronas humanas TH/DA. Esto puede ser de importancia para el desarrollo de estrategias farmacológicas y de terapia celular para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

O 88

VÍAS INTRACELULARES DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL PROMOVIDAS POR ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE MUERTE TIPO FAS

Solé C^a, Docet X^b, Segura MF^a, Gutiérrez HV^b, Davis AM^b, Comella JX^a

^aDepartament Ciències Mèdiques Bàsiques. Univ. de Lleida.

^bDepartment of Pre-clinical Veterinary Science, Royal (Dick) School of Veterinary Studies, Scotland

En 1999, se aisló una nueva proteína cuya principal característica era su capacidad para rescatar de la muerte inducida por Fas, FAIM (*Fas apoptosis-inhibitory molecule*). Actualmente, se conocen dos isoformas, la forma corta (FAIM-S) y la larga (FAIM-L). Su distribución es citosólica y no comparte regiones de homología con ninguna otra proteína conocida. La forma larga es exclusiva del sistema nervioso. Aquí presentamos una nueva función para esta proteína: potencia la diferenciación neuronal promovida por factores neurotróficos. Cuando tratamos células PC12 y cultivos primarios de neuronas del ganglio cervical superior con NGF, se observa que las células sobreexpresoras de FAIM-S tienen un crecimiento neurítico mayor. Lo mismo ocurre cuando se tratan neuronas corticales con BDNF. La activación de la vía Ras/MAPK es necesaria para la diferenciación de las células, pero no está modulada por el nivel de expresión de FAIM-S. Se observa un incremento de la actividad del factor de transcripción NFκB, tras tratar con NGF en las PC12 estables con FAIM-S. Finalmente, hemos comprobado que se puede inhibir la diferenciación si se bloquea esta vía sobreexpresando formas dominantes negativas o cultivando neuronas de ratones transgénicos que no expresan la subunidad p65 de NFκB. Se concluye que el efecto que FAIM-S provoca en la diferenciación pasa a través de la vía del NFκB.

Financiado por Fondo de Investigaciones Sanitarias (MSC), Fundació La Caixa y Generalitat de Catalunya. C. Solé es becaria MECO

O 89

IMPLICACION DE LOS ANTAGONISTAS DE FAS, FAIM Y LIFEGUARD EN LA APOPTOSIS DE CÉLULAS DEL TIPO II: IMPLICACIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO

Segura MF, Solé C, Gozzelino R, Comella JX

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Universitat de Lleida

Los receptores de muerte son proteínas integrales de membrana y la unión con sus respectivos ligandos desencadena la muerte apoptótica de la célula. El tipo de muerte dependerá del tipo celular: en las llamadas células tipo I, tras la activación del receptor se activan las caspasas iniciadoras que a su vez procesarán a las caspasas ejecutoras destruyendo substratos vitales para la célula. En cambio en las células tipo II, se requiere una amplificación de la señal apoptótica a través de la mitocondria. Poco se conoce sobre la funcionalidad de los receptores de muerte en el sistema nervioso, aunque recientemente se les ha implicado en determinadas enfermedades neurodegenerativas. A finales de la década de los 90 se describieron dos antagonistas, del receptor de muerte Fas con elevada expresión en el sistema nervioso, las proteínas FAIM y Lifeguard de las cuales aun hoy hay un pobre conocimiento. Descritos inicialmente como antagonistas generales de la muerte inducida por Fas, resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que su relevancia funcional se limita a células de tipo II, pero su función antiapoptótica se extiende a otros receptores de muerte como el receptor para TNF. Nuestros resultados suponen una caracterización detallada de estos dos tipos de muerte celular en líneas de estirpe neuronal. Financiado por Fondo de Investigaciones Sanitarias (MSC), Fundació La Caixa y Generalitat de Catalunya. M.F. Segura es becario MECO.

O 90

LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR VERATRIDINA ES BLOQUEADA POR UN ANTISENtido DE P53

Jordán J, Galindo MF, González-García C, Ceña V

Centro Regional de Investigaciones Biomédicas,
Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete

El factor de transcripción p53 es un potente regulador transcripcional de genes implicados en numerosas funciones celulares entre las que se incluye el control del ciclo celular y la apoptosis. Hemos examinado el papel de p53 en la muerte neuronal inducida por veratridina. La exposición de cultivos de neuronas de hipocampo de rata a veratridina (0,3-100 µM) resulta neurotóxica dependiente de la dosis. La inmunorreactividad de p53, que no se detectó en cultivos control, se observó en aproximadamente un 25% de las neuronas, transcurridas 7 h del tratamiento con veratridina (30 µM). Fármacos que bloquean la entrada de Na⁺, como la tetrodotoxina o la retirada del ión Ca²⁺ del medio extracelular, previenen tanto la muerte neuronal como la inmunoreactividad de p53. El alcaloide colapsa el potencial mitocondrial, en un mecanismo que requiere la entrada de Ca²⁺ en la neurona. Tratamientos con fármacos que bloquean el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, como la ciclosporina A o el ácido bongkreico previenen la inducción de inmunoreactividad para p53 y la muerte neuronal en los cultivos. El bloqueo de la expresión de p53 mediante oligonucleótidos antisentido específicos induce un incremento significativo de supervivencia en los cultivos neuronales expuestos a veratridina. Nuestros resultados sugieren que el factor de transcripción p53 está implicado en la muerte neuronal inducida por veratridina.

Financiado, en parte, por los proyectos BFI2001-1565 del MCYT; G03/167 Minist de Sanidad, GC-02-019 and PAI-02-031 de Consejería de Ciencia y Tecnología, JCCM y por la Fundación Campollano-Banco Santander Central Hispano a V.C., BFI2001-1058 del MCYT, GC02-029 de la Consejería de Sanidad JCCM a C.G.G. y SAF2002-04721 de la CICYT a J.J. MFG es becaria de JCCM

O 91

STAT1: UNA SEÑAL DE MUERTE INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO Y CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN CULTIVOS DE ASTROCITOSGorina R^a Petegnief V^a Sanfeliu C^a Chamorro A^b Planas AM^a^a Departamento de Farmacología y Toxicología, IIBB-CSIC, IDIBAPS.^b Instituto de Enfermedades Neurológicas, Hospital Clínic, IDIBAPS. Barcelona

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan durante la reoxigenación en la isquemia cerebral y contribuyen al daño por reperusión. El H₂O₂ es una especie reactiva al oxígeno que causa toxicidad y muerte celular por estrés oxidativo. STAT1 es un miembro de la familia STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción) que se activa por citocinas y participa en la respuesta inmune e inflamatoria. En este trabajo hemos estudiado la implicación de STAT1 en la muerte inducida por estrés oxidativo y citocinas en cultivo de astrocitos. Hemos tratado los cultivos primarios de astrocitos de corteza de rata (a los 11 div) con: H₂O₂ 0,3 mM durante 1 hora, IL-6 (100 ng/mL), IL-10 (10-100 ng/mL), o IFN-γ (0.5 ng/mL) y hemos estudiado su efecto sobre la viabilidad celular a las 24 horas mediante el método de exclusión celular del azul de tripán, y el ensayo de la actividad caspasa-3. Por *Western blot*, hemos estudiado la activación (fosforilación) de STAT1 en astrocitos 30 min después de la lesión. Los tratamientos con H₂O₂, IFN-γ, e IL-6 activan STAT1, y provocan muerte en los cultivos de astrocitos, pero no el tratamiento con IL-10. AG490 (0,03 mM, 30 min antes de los tratamientos), un inhibidor de la *Janus Kinasa* (JAK2) que bloquea la vía JAK/STAT e impide la fosforilación de STAT1, protege completamente de la muerte por H₂O₂, IFN-γ, o IL-6. Los presentes resultados muestran que la muerte inducida por estrés oxidativo y citocinas proinflamatorias está mediada por STAT1.

O 92

ACTIVACIÓN DE MMP-3 EN LA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL EN LA RATASolé S^a Justicia C^a Chamorro A^b Planas AM^a^a Departamento de Farmacología y Toxicología, IIBB-CSIC, IDIBAPS^b Instituto de Enfermedades Neurológicas, Hospital Clínic, IDIBAPS. Barcelona

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular y de la lámina basal del endotelio vascular, se han relacionado con diversos procesos patológicos e inflamatorios entre ellos la isquemia cerebral. Previamente mostramos alteraciones en la actividad de la MMP-9 y MMP-2 en la isquemia cerebral focal en la rata. En el presente trabajo estudiamos el efecto de la isquemia sobre la MMP-3. A diferentes tiempos después de la reperusión evaluamos la expresión y activación de la MMP-3 mediante: *Western blot*, cimgografía, inmunohistoquímica y mediante un ensayo enzimático que consiste en determinar la proteólisis de un sustrato fluorogénico. También hemos estudiado la expresión y distribución celular de un posible sustrato de la MMP-3, la agrina. Encontramos expresión de la MMP-3 en neuronas que degeneran a las 24 horas y en la microglia reactiva a los 4 días. Por western vemos un aumento de la MMP-3 a los 4 días que se confirma con una activación del enzima visto con el uso del sustrato fluorogénico. La agrina (SN) la encontramos en neuronas, en astrocitos reactivos y en las vesículas de fagocitosis de la microglia reactiva a los 4 días. Así pues la MMP-3 podría tener un papel en la muerte neuronal y en la activación microglial donde podría contribuir a la fagocitosis de sustancias como la agrina.

Sistemas sensoriales: auditivo y somestésico**Moderadores: M. Merchán y A. Núñez**

O 93

INFLUENCIA DE LA PROYECCIÓN COMISURAL SOBRE LAS NEURONAS DEL COLÍCULO INFERIOR MEDIANTE SU INACTIVACIÓN REVERSIBLE CON ÁCIDO QUINURÉNICOHernández O^a, Rees A^b, Malmierca MS^a^a Laboratorio de Neurobiología de la Audición, Unidad de Neurofisiología

Auditiva, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de

Salamanca. ^b School of Neurology, Neurobiology and Psychiatry,

The Medical School, University of Newcastle upon Tyne, UK

El colículo inferior (CI) se comunica con su homólogo contralateral a través de la proyección comisural, que es laminar, simétrica y tonotópica. Sin embargo queda por esclarecer su significado funcional y su posible implicación en la localización del sonido. Por tanto, nuestro objetivo es conocer las implicaciones funcionales de la proyección comisural en la modificación y generación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del CI. Para ello, hemos realizado registros en la rata, *in vivo*, en 24 unidades neuronales del CI, antes, durante y después del bloqueo químico de la proyección comisural mediante la inyección de ác. quinurénico en el CI contralateral. En las unidades registradas se analizaron las propiedades espectrales, temporales monoauriculares y binauriculares y los efectos son básicamente de tres tipos: descenso, aumento y mixto. Además hemos registrado 20 unidades sin ninguna manipulación farmacológica para estudiar la variabilidad, si la hubiere, en la respuesta de las neuronas del CI a lo largo del tiempo. Así mismo, hemos realizado un control adicional inyectando solución Locke (vehículo del ác. quinurénico) en el CI contralateral. Nuestros resultados demuestran que las neuronas del CI están sometidas a la influencia de la proyección comisural y que ésta afecta las propiedades monoauriculares y binauriculares de las mismas. Este estudio ha sido financiado por JCyL-UE (SA084/01), The Wellcome Trust (066348), DGES (BFI2000-1396) y MCYT (FP2000-5811).

O 94

DISTRIBUCIÓN DEL NEUROPEPTIDO Met-8 EN EL SISTEMA AUDITIVO CENTRAL DE LA RATA: ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO

Aguilar L ^{a,b}, Malmierca MS ^a, Coveñas R ^a, Lopez-Poveda EA ^a, Merchán M ^a

^aInstituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca. España. ^bFundación Carolina. España

Los neuropéptidos se caracterizan por sus múltiples efectos y amplia distribución en el SNC. El objetivo de este estudio es determinar la distribución y tipología de las neuronas inmunorreactivas a Met-8 en núcleos del sistema auditivo central de la rata. Utilizamos cuatro ratas Wistar, de las cuales dos recibieron una inyección intraventricular de colchicina. Los animales perfundieron y las secciones seriadas flotantes se revelaron inmunocitoquímicamente usando un anticuerpo policlonal cedido J. Tramu. Por su morfología y distribución topográfica se identificaron células inmunorreactivas en el núcleo coclear dorsal (NCD), área marginal del núcleo ventral (NCV), oliva superior lateral (OLS), núcleo ventral del cuerpo trapezoide (NVCT), colículo inferior (CI) y corteza auditiva (CA). Observamos fibras inmunorreactivas en: NCD, NCV, núcleo medial del cuerpo trapezoide, NVCT y núcleo lateral del cuerpo trapezoide, oliva superior medial; lemnisco lateral; CI; cuerpo geniculado medial y CA. Nuestros datos sugieren que las células inmunorreactivas a Met-8 pueden estar implicadas en la vía extralemniscal (integración multisensorial), así como en la vía descendente. Estudio financiado por: MCyT (proy. DGES Nro. BFI2000-1396), JCyL (proy. SA084/01), Fundación Carolina.

O 95

NEURONAS DEL COLÍCULO INFERIOR ESPECIALIZADAS EN ESTÍMULOS NUEVOS

Malmierca MS ^a, Pérez-González D ^a, Hernández O ^a, Covey E ^b

^aLaboratorio de Neurobiología de la Audición, Unidad de Neurofisiología Auditiva, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca.

^bDepartment of Psychology. University of Washington. Seattle, USA

El colículo inferior (CI) es un centro de relevo importante dentro de la vía auditiva porque la mayoría de los impulsos hacia la corteza auditiva tiene que hacer sinapsis en él. Existen muchos estudios electrofisiológicos que han descrito en detalle las características temporales, espectrales y biauriculares de las neuronas del CI ante estimulación con tonos puros y otros más complejos, pero hasta el momento nadie ha estudiado y comparado las respuestas de neuronas cuando el estímulo es monótono o nuevo. En este estudio, tras aislar diversas unidades neuronales del CI de la rata, hemos procedido a la estimulación de las mismas sin cambiar las características del estímulo y cambiando diferentes parámetros tales como la duración del sonido, frecuencia del sonido, frecuencia de estimulación, intensidad del sonido, etc. De esta forma hemos podido comprobar que la mayoría de las neuronas no responden mejor ante estímulos nuevos, pero existen algunas que responden mejor, o incluso solamente, cuando presentamos estímulos nuevos. Por lo tanto podemos concluir que el colículo inferior de la rata posee una población neuronal específica que está especializada en la codificación de estímulos nuevos. Estos datos sugieren que existen procesos plásticos en el colículo inferior. Agradecemos el apoyo técnico informático de Brandon Warren. Este estudio se ha financiado por JCyL-UE (SA084/01, MSM), DGES (BFI2000-1396, MSM) y MCyT (FP2000-5811, OH) y NIH (DC00607 para EC).

O 96

TIPOS DE RESPUESTAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS NEURONAS EN EL COLÍCULO INFERIOR DE LA RATA TRAS ESTIMULAR CON TONOS PUROS

Espinosa N, Hernández O, Moore J, Malmierca MS

Laboratorio de Neurobiología de la Audición, Unidad de Neurofisiología, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca

Diversos estudios han analizado las respuestas electrofisiológicas de las neuronas del colículo inferior (CI) de diferentes mamíferos tras estimulación con tonos puros. El objetivo de este trabajo es analizar dichas propiedades en la rata, para ver la similitud y posibles diferencias en el procesamiento del sonido. Para ello, hemos clasificando los tipos de respuesta temporales y espectrales, de más de 100 neuronas del CI. Para cada unidad neuronal, debidamente aislada, se obtuvieron histogramas periestímulo variando el tipo intensidad interaural, clasificándolas como de tipo encendido, encendido-pausa-sostenido, encendido-sostenido o sostenido y de tipo monótona o no-monótona. Entre otras cosas, estudiamos la variación de la latencia en función de la frecuencia mejor, así como su sintonía a la duración del estímulo. Las propiedades espectrales se analizaron mediante los mapas de frecuencia que indicaron si el tipo de campo receptivo correspondía a V o no-V (desviado a altas o bajas frecuencias, cerrado, estrecho o de picos múltiples). Se estudió el cambio de la pendiente de las curvas de sintonía para cada clase, así como la variación del umbral mínimo y los factores de calidad Q. En las unidades con una alta actividad espontánea analizamos las características en las zonas inhibitorias de frecuencias baja y alta. Este estudio ha sido financiado por JCyL-UE (SA084/01), The Wellcome Trust (066348), DGES (BFI2000-1396), MCyT (FP2000-5811-OHG) y USAL-BSCH (NEV).

O 97

ESTUDIO DE LAS INTERCONEXIONES FUNCIONALES ENTRE LOS NÚCLEOS PRINCIPALIS Y ORALIS DEL TRIGÉMINO

Moreno A, Bonacasa V, Panetsos F

Departamento de Biomatemática, Fac. de Biología, Universidad Complutense de Madrid

La organización anatómica y funcional del complejo nuclear sensorial del trigémino (CNST) ha sido de gran interés para numerosos investigadores. El CNST se caracteriza por su alta complejidad neuronal y su capacidad integradora de la información sensorial y nociceptiva procedente de las regiones oftálmica, maxilar y mandibular. Contiene una extensa red de conexiones intersubnucleares dirigidas tanto rostral como caudalmente, originadas por neuronas situadas en todos los subnúcleos del CNST. El objetivo de este trabajo es el estudio funcional de las interconexiones entre los subnúcleos *principalis* (PrV) y *oralis* (Vo). Para ello se realizaron dos tipos de estudio en ratas Wistar anestesiadas. Mediante estereotaxia se situaron multielectrodos unitarios de registro tanto en PrV como en Vo, estimulando mecánicamente las vibrissas ipsilaterales. Posteriormente se situó un electrodo de estimulación en Vo y se realizaron múltiples registros unitarios de la actividad neuronal en PrV. El estudio de dichas interconexiones indican su papel de relevo para la integración de la información sensorial.

O 98**PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN EN LA VÍA SOMATOSENSORIAL: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD EN EL NERVO CIÁTICO POR MEDIO DE MICROELECTRODOS DE TAMIZ**

Bonacasa V, Moreno A, Makarov VA, Panetsos F

Departamento de Biomatemática, Fac. de Biología, Universidad Complutense de Madrid

La percepción del mundo externo por el sistema nervioso central (SNC) es el resultado de la interacción constante entre las señales entrantes y las representaciones dinámicas internas del mundo exterior. Las neuronas codifican las señales entrantes mediante funciones lineales entre la intensidad del estímulo y la frecuencia de disparo, pero datos recientes sugieren que otros procedimientos más complejos y eficaces, como la actividad sincrónica, el intervalo entre espigas y el comportamiento oscilatorio, juegan un papel importante en el procesamiento de la información. El objetivo del presente trabajo es estudiar el papel de estos procedimientos en el procesamiento de la información somatosensorial y en la creación de representaciones internas de estímulos reales. Para ello se implantan microelectrodos de tamiz en el nervio ciático de ratas. El nervio regenera a través de los agujeros del tamiz. Después se estimula la piel de los dedos mecánicamente y se registra la actividad de los pequeños grupos de fibras que han crecido a través de los agujeros del tamiz; así como la actividad extracelular en el núcleo gracilis. Esto es posible gracias a la buena regeneración funcional conseguida. Posteriormente se analizan los datos y se construyen modelos matemáticos que describen la dinámica compleja de las interacciones neuronales, y permiten orientar los procedimientos de análisis de la gran cantidad de datos obtenidos en los registros multielectrodo.

O 99**CLASIFICACIÓN DE SUBREDES NEURONALES INVOLUCRADAS EN EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN SENSORIAL EN NÚCLEOS DEL CORDÓN POSTERIOR**De Feo O^a, Makarov VA^b, Panetsos F^b*^aLaboratory of Nonlinear Systems, Swiss Federal Institute of Technology Lausanne, Lausanne, Switzerland. ^b Dept. de Biomatemática, Escuela de Óptica, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España*

En el presente trabajo hemos estudiado los principios básicos de procesamiento de la información sensorial en los núcleos del cordón posterior (NCP). Estos núcleos, de gran sencillez estructural y fisiológica, contienen unas 10^4 - 10^5 neuronas masivamente interconectadas entre sí. Para llegar a comprender el funcionamiento del sistema completo es imprescindible la selección, descripción matemática y clasificación de subredes locales más pequeñas, de las que se componen los NCP. Esta selección tiene que ser realizada teniendo en cuenta principios funcionales más que morfológicos. Una vez identificadas estas redes pueden servir para construir sistemas más complejos y para el estudio de sus características. Hemos registrado tanto la actividad global (que representa, en cierto sentido, el comportamiento integral del sistema) como trenes de espigas de neuronas aisladas. Para identificar posibles conexiones sinápticas entre neuronas que afecten significativamente al comportamiento de la red, hemos analizado los datos estadísticamente y, además, hemos formulado modelos determinísticos de estas redes. Basándonos en este estudio hemos construido y clasificado modelos gráficos (*graphs*) de subredes neuronales que participan en el procesamiento previo de la información sensorial. El método estadístico utilizado está fundamentado en los cálculos de coherencia espectral parcial, mientras que el método determinístico está basado en la estimación de la matriz de enlaces utilizando el modelo de integración y disparo para describir la dinámica de neuronas. Los dos métodos han dado lugar a resultados compatibles, confirmando las conclusiones sobre la organización de modelos gráficos de subredes locales y su clasificación.

100**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN SENSORIAL EN LAS NEURONAS DE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL PRIMARIA DE LA RATA**

Alenda A, Núñez A

Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

Para estudiar la interacción de estímulos sensoriales en la corteza somestésica primaria (SI), se registraron extracelularmente 58 neuronas de ratas anestesiadas con pentobarbital (33 mg/kg). Se estimuló táctilmente el campo receptivo de la neurona de SI (control) con un émbolo (1 mm de diámetro). Simultáneamente se estimuló táctilmente la otra pata. En situación control, la respuesta somestésica fue de 3,1 espigas por estímulo. Durante la estimulación simultánea de ambas patas la respuesta de la neurona disminuyó (30,5%). A la disminución de la respuesta en esta situación la denominamos «distracción». Se aplicó atropina (0,1 mL; 1,4 mM) y mecamelamina (0,1 mL; 1 mM), antagonistas de receptores muscarínicos y nicotínicos, respectivamente, sobre la SI. La atropina disminuyó significativamente la distracción hasta un 11%, mientras que en presencia de mecamelamina la distracción no fue alterada. Estimulación eléctrica en SI contralateral, precediendo a la estimulación táctil del campo receptivo de la neurona a intervalos de 50, 100 y 500 ms, provocó una disminución de la respuesta somestésica (59%, 35% y 21%, respectivamente). A diferencia de la distracción, esta inhibición no fue afectada por atropina. Los resultados muestran una interacción entre estímulos somatosensoriales en SI («distracción»). El hecho de que se afecte por antagonistas muscarínicos sugiere que debe implicar la activación del prosencéfalo basal. Proyecto subvencionado por el proyecto CAM 08.5/006/2001.

Bases neuronales del comportamiento**Moderadores: A. Tobeña y A. Gruart****O 101****¿ESTÁN LAS EMOCIONES EN EL CEREBRO? UN ANÁLISIS CONCEPTUAL**Acero JJ^a, Morales A^b*^aDepartamento de Filosofía, Universidad de Granada. ^bDepartamento de Psicología Experimental y Fisiología del Comportamiento e Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada*

La concepción reduccionista de la mente considera las funciones psíquicas idénticas a la actividad de redes neuronales específicas. Aunque este tipo de enfoque se halla extendido en la comunidad científica, se ha señalado las paradojas conceptuales a las que se ve abocado (Bennett MR, Hacker PMS. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 499-54). En esta comunicación se insiste en una línea crítica parecida a propósito de la tesis de que las emociones son funciones biológicas del sistema nervioso. Para ello, se analiza el diseño experimental y la metodología empleada por Adolphs y otros al estudiar personas aquejadas de lesiones degenerativas que afectan a los núcleos amigdalinos (bilateralmente). Una conclusión de esos trabajos es que «...to recognize someone as afraid, the amygdala must make the sight of the fearful face activate myriad cortical and subcortical regions, whose ensemble, temporally coordinated activity substitutes the concept of fear» (Adolphs A, et al. *J Neurosci* 1995; 15: 5879-91).

En esta comunicación se defiende, primero, que las tareas experimentales que han de realizar los sujetos de esos estudios suponen la movilización de recursos propios de complejas interacciones que se dan, y adquieren significado, en la esfera social y, segundo, que las categorías conceptuales con que se clasifican los estímulos y las funciones de las estructuras amigdalinas (Adolphs A. *Neuropsychologia* 2003; 41: 119-26) hacen poco plausible la interpretación reduccionista de la neurobiología cognitiva del comportamiento social.

O 102

PLASTICIDAD TRANSMODAL EN SUJETOS CIEGOS: ¿ES POSIBLE LA ACTIVIDAD VISUAL EN UNA CORTEZA DESAFERENTIZADA?

Alfaro A^{a,b}, Climent R^a, Vilanova H^a, Tormos JM^a, Pascual-Leone A^a, Leiva C^b, Martín C^b, García-Escrivá A^b, Botella C^c, Fernández E^a

^a Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández.

^b Servicio de Neurología, Hospital General Universitario de Alicante.

^c Servicio de Neurocirugía, Hospital General Universitario de Alicante

En ausencia de *input* visual, la corteza occipital es receptiva a las aferencias de otras modalidades sensoriales, implicándose en tareas de discriminación somatosensorial, lectura Braille o identificación de sonidos. Este fenómeno denominado «plasticidad transmodal» pone de manifiesto la gran capacidad adaptativa de la corteza visual desaferezada así como su viabilidad anatómica y funcional. Ya que la corteza occipital en condiciones de privación, puede procesar otras modalidades sensoriales, cabe preguntarse hasta que punto sería capaz de generar experiencia visual consciente. En este trabajo abordamos dicha problemática desde dos aproximaciones, por una parte nuestra experiencia clínica, mediante la descripción de una serie de pacientes invidentes con cuadros alucinatorios visuales debidos a patologías orgánicas y neuropsiquiátricas bien definidas; en segundo lugar realizamos un abordaje experimental, usando técnicas de neuroimagen y estimulación magnética transcranial, en dos grupos de individuos ciegos clasificados en función del tiempo de evolución de su ceguera y experiencia visual previa. Nuestros resultados muestran que la privación no impide que la corteza occipital en determinadas condiciones clínicas y experimentales sea capaz de evocar sensaciones visuales incluso en el contexto de cortezas desaferezadas durante largo tiempo.

Subvencionado por el Proyecto Europeo CORTIVIS (QLK6-CT-2001-00279).

O 103

BASES NEURALES DEL VALOR ATRACTIVO INNATO DE LAS FEROMONAS SEXUALES EN RATONES

Moncho-Bogani J^a, Lanuza E^b, Novejarque A^a, Martínez-García F^a

^a Dept. de Biología Funcional y Antropología Física, Universitat de València.

^b Dept. de Biología Celular, Universitat de València

Las feromonas sexuales de ratones macho (detectadas por el órgano vomeronasal) son intrínsecamente atractivas para las hembras, a diferencia de sus olores asociados (volátiles) que adquieren valor atractivo por asociación con aquellas (Moncho-Bogani, et al. *Physiol Behav* 2002; 77:167-76). El comportamiento sexual femenino depende del estado hormonal, por lo que quisimos comprobar si los esteroides sexuales modulan la atracción por feromonas de macho en hembras ovariectomizadas. Los datos indican que el sustrato neural de esta atracción no incluye neuronas sensibles a esteroides.

Para aclarar el sustrato neural del valor atractivo (reforzante) innato de las feromonas sexuales de machos estudiamos la expresión de c-Fos inducida por éstas en el cerebro de hembras. Aunque el área ventral tegmental no muestra actividad, en el núcleo *accumbens* (*shell* medial) la actividad c-Fos es superior en hembras expuestas a feromonas que en hembras no expuestas. Ello sugiere que el valor reforzante de las feromonas sexuales se debe a proyecciones de la amígdala basolateral y medial/cortical posteromedial sobre el núcleo *accumbens*, lo que comprobaremos estudiando la expresión de c-Fos en la amígdala de estos animales. El estudio de la expresión de c-Fos en hembras expuestas a olores con y sin experiencia con feromonas desvelará si en la amígdala se produce la asociación feromonas-olores conducente a la formación de memorias emocionales reforzantes.

Financiado por MCYT y FEDER (BFI2001-3535)

O 104

IMPACTO METABÓLICO Y CONDUCTUAL DE LA ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL REPETITIVA: MECANISMO DE ACCIÓN DE UNA HERRAMIENTA AL SERVICIO DE LA CIENCIA COGNITIVA Y LA TERAPIA NEURORREHABILITADORA

Valero-Cabré A^{a,b}, Payne BR^b, Pascual-Leone A^a

^a Dept. Neurology, Harvard Medical School-BIDMC. Boston, USA.

^b Dept. Anatomy and Neurobiology, Boston University Medical School. Boston, USA

La estimulación magnética transcranial repetitiva (EMTr) tiene la capacidad de «silenciar» regiones cerebrales y afectar el desarrollo de tareas cognitivas en humanos. Sin embargo, el conocimiento sobre su mecanismo de acción y sus repercusiones conductuales es todavía incompleto. Dos gatos anestesiados (TMS n=2) fueron estimulados con trenes de EMT a 20 Hz durante 28 minutos en la corteza suprasilviana posterior (pMS) del hemisferio derecho. Tres animales control recibieron EMT ficticia en la misma región (SHAM n=1) o EMT real en la corteza somatomotora. (SMC n=2), a frecuencias idénticas. Durante la estimulación, se inyectaron 4 dosis (25 mCi/kg) de 2-deoxiglucosa marcada con 14C (14C-2DG). La EMT produjo una disminución significativa de la captación celular de 14C-2DG en la corteza estimulada (8-17% respecto del hemisferio contralateral). Una desactivación significativa mediada por vías transináptica cortico-corticales fue detectada en las áreas visuales 19 (A19: 4-7%) y 18 (A18: 6-10%) y en el área visual esplénica (SVA: 6-7%). También se produjo la desactivación transináptica de varias dianas subcorticales como el colículo superior (SC: 6-9%) y el núcleo pulvinar del tálamo (P: 5-7%) todas ellas con con ricas conexiones procedentes de la corteza pMS. La estimulación magnética transcranial tiene la capacidad de reducir el metabolismo basal de las regiones corticales impactadas e inducir la desactivación transináptica de regiones con las que éstas mantiene conexiones.

O 105

PROPIEDADES FUNCIONALES Y CAPACIDAD DE APRENDIZAJE ASOCIATIVO EN UN MODELO ANIMAL DE DEGENERACIÓN CEREBELOSA (RATÓN MUTANTE LURCHER)

Porras-García E^a, Cendelin J^b, Domínguez del Toro E^a, Sánchez-Campusano R^a, Vozeh F^b, Delgado-García JM^a

^a División de Neurociencias, L.A.B., Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.

^b Ústav Patologické Fyziologie Lékařské Fakulty UK. Plzeň, República Checa

El ratón Lurcher se caracteriza porque en el estado adulto presenta, debido a una mutación, una degeneración casi completa de las células de Purkinje. Así, este ratón representa un excelente modelo para el estudio del papel de la corteza cerebelosa en la adquisición de nuevas habilidades motoras. Se estudió el comportamiento de ratones silvestres (+/+) y Lurcher (Lc/+) en diversas pruebas conductuales (campo abierto, piscina de Morris, Rotarod, etc.). Para las pruebas de aprendizaje asociativo, se implantaron dos electrodos de 50 µm de diámetro en el nervio supraorbitario y otros dos electrodos en el músculo *orbicularis oculi*. El condicionamiento consistió en la presentación de un estímulo condicionado (EC, un pulso catódico de 50 µs a 1,5 × Umbral, o un tono a 2400 Hz durante 250 ms) seguido 250 ms más tarde por un estímulo incondicionado (EI, un pulso catódico de 0,5 ms a 3 × Umbral). Se realizaron dos sesiones de habituación, 10 de condicionamiento y 4 de extinción. En cada sesión se presentaron 60 parejas de EC-EI, con un intervalo entre presentaciones de 30 ± 5 s. Las pruebas comportamentales mostraron un déficit evidente en la capacidad motora de los ratones Lurcher. Las curvas de aprendizaje de los ratones Lurcher fueron similares a las de los ratones silvestres. En ambos casos las curvas de aprendizaje alcanzaron un máximo en las sesiones 4.^a-5.^a, aunque los ratones Lurcher presentaron una fase inicial de adquisición más rápida que la de los silvestres. En conclusión, el condicionamiento clásico del

reflejo corneal en el ratón Lurcher sugiere que la corteza cerebelosa no es necesaria para este tipo de aprendizaje en el animal adulto. Realizado con ayudas de La Caixa, JA/CV1122 y DGICYT (BF12002-00936).

O 106

ESTUDIO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD DE APRENDIZAJE DE RATONES NORMALES Y RATONES TRANSGÉNICOS CON DÉFICIT TIPO ALZHEIMER

Rodríguez-Moreno A^a, Porras-García E^a, Sánchez-Campusano R^a, Böhme GA^b, Benavides J^b, Domínguez del Toro E^a, Delgado-García JM^a

^aDivisión de Neurociencias, L.A.B., Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.

^bNeurodegenerative Diseases Group, Aventis Pharma S.A. Vitry-sur-Seine, Francia

Se ha estudiado la capacidad de aprendizaje asociativo en ratones silvestres y en transgénicos (C57BL/6) con déficit tipo Alzheimer (sobreexpresión de APP695), usando como modelo de aprendizaje el condicionamiento clásico del parpadeo. Se implantaron dos electrodos de 50 µm en el nervio supraorbitario y otros dos en el músculo *orbicularis oculi*. El condicionamiento consistió en la presentación de 60 parejas de pulsos/sesión, usando como estímulo condicionado (CS) un pulso cuadrado de 50 µs, 1,5×Umbral, seguido 250 ms más tarde de un estímulo incondicionado (US) que consistió en un pulso cuadrado de 0,5 ms, 3×Umbral. Las parejas de CS-US se presentaron cada 30±5 s. Se realizaron dos sesiones de habituación, 10 de condicionamiento y cuatro de extinción. Se ha demostrado que el EMG del músculo *orbicularis oculi* es un buen parámetro para identificar la presencia de auténticas respuestas condicionadas. El máximo porcentaje de respuestas condicionadas se alcanzó para dos cepas de ratones silvestres (C57 y Swiss) de la 5.^a-7.^a sesión. La curva de aprendizaje fue más rápida para los ratones C57 que para los Swiss, pero ambos alcanzaron una asíntota similar y, por tanto, un nivel similar de aprendizaje. Además, se usaron ratones C57 que sobreexpresan APP para evaluar los efectos de esta sobreexpresión en la adquisición de las respuestas condicionadas. Se encontró que los ratones APP no son capaces de adquirir el condicionamiento clásico del reflejo corneal. Además, el estudio en rodajas de CA1 de hipocampo mostró que los ratones APP no tienen una alteración significativa en la transmisión sináptica basal, pero sí en la respuesta de facilitación a parejas de pulsos y en la LTP.

Financiado por Aventis-Pharma, La Caixa, Junta Andalucía y DGICYT (BF12002-00936).

O 107

LA PÉRDIDA DE NEURONAS COLINÉRGICAS SEPTALES PRODUCE UN DÉFICIT EN LOS PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

Fontán A, Múnera A, Troncoso J, Carrión AM, Delgado-García JM
División De Neurociencias, L.A.B., Universidad Pablo de Olavide. Sevilla

La enfermedad de Alzheimer es quizás la de mayor incidencia dentro de la población de ancianos; por ello, el establecimiento de las bases celulares y moleculares que concurren en esta enfermedad es de gran importancia para determinar su prevención y/o tratamiento. En nuestro laboratorio, hemos desarrollado un modelo de neurodegeneración selectiva de las neuronas colinérgicas del núcleo del septo medial en ratas, utilizando una inmunotoxina creada mediante el acoplamiento químico de la toxina saporina al anticuerpo contra el receptor de ngf de baja afinidad. La administración local (mediante microinyección) de 50 ng de inmunotoxina ocasiona una pérdida de neuronas colinérgicas del septum de aproximadamente el 80%, cuantificada tres semanas después de la inyección. Este modelo se asemeja a lo que ocurre en las primeras fases de la enfermedad de Alzheimer y, por lo tanto, podía ser útil para el estudio de esta enfermedad. Para comprobar si el déficit de neuronas colinérgicas septales produce una sintomatología similar a la que ocurre

en enfermos de Alzheimer, hemos evaluado la capacidad de las ratas lesionadas para aprender un condicionamiento clásico del reflejo corneal y un condicionamiento de tipo instrumental. El rendimiento de las ratas con el septo lesionado en ambas pruebas es significativamente menor, comparadas con los animales inyectados con salino. Estos resultados demuestran que las neuronas colinérgicas septales son importantes para el aprendizaje de nuevas tareas motoras de tipo asociativo. Además, estos datos demuestran que el modelo de neurodegeneración colinérgica podría ser de utilidad para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.

Trabajo financiado por La Caixa, JA/CV1-122, FISSS (01-0194) y DGICYT (BF12002-00936).

O 108

NIVEL DE SUPRESIÓN DE LA RESPUESTA Y EFECTOS DE LA ANFETAMINA SOBRE LA BEBIDA ADJUNTIVA CASTIGADA NEGATIVAMENTE

Pérez-Padilla A, Pellón R

Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid

Las ratas fueron primero expuestas a un programa múltiple de tiempo fijo (TF) 30-s TF 30-s de administración de la comida. Se dividieron entonces los animales en dos grupos, siendo sometidos a diferentes programas múltiples: TF 30-s TF 45-s o TF 30-s TF 90-s. El componente de TF 45-s / TF 90-s fue señalado con un tono. Se desarrollaron niveles altos y semejantes de bebida adjuntiva en ambos componentes de TF 30-s, ocurrieron niveles intermedios de bebida en el componente de TF 45-s y se observó poca bebida en el componente de TF 90-s. La bebida durante los componentes de TF 30-s fue después castigada por demoras señaladas (por la oscuridad de las cajas) en la administración de la siguiente bolita de comida y contingentes a cada lametón. Se ajustó la duración de las demoras para reducir la bebida a los niveles obtenidos en los componentes de TF 45-s o de TF 90-s, respectivamente para cada uno de los dos grupos. La bebida castigada fue incrementada por dosis de 0,3 y 1,0 mg/kg de *d*-anfetamina, pero este efecto fue mayor en el grupo de TF 30-s TF 90-s. La bebida no se alteró en el componente de TF 45-s, pero la droga a la dosis de 1,0 mg/kg también incrementó las respuestas en el componente de TF 90-s. Dado que la bebida disminuyó durante el componente de TF 90-s cuando se introdujo la contingencia de castigo, se retiraron completamente el procedimiento de castigo y el componente de TF 30-s. Se probó de nuevo la *d*-anfetamina y se encontró que no tuvo efecto en esta ocasión. Estos resultados amplían nuestro conocimiento sobre los mecanismos conductuales que pudiesen ser responsables de los efectos anticastigo de la anfetamina sobre la bebida adjuntiva castigada negativamente.

Neurotransmisores y receptores

Moderadores: R. Rigual y J. del Río

O 109

LA PROTEÍNA RIC-3: UN EFECTOR DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES

Castillo M, Mulet J, Sala S, Sala F, Criado M

Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC.
Sant Joan d'Alacant

Los receptores nicotínicos neuronales de acetilcolina (nAChR) pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando y están compuestos por varias subunidades que se han de ensamblar en el retículo endoplásmico, exportarse hasta la membrana plasmática y situarse en los lugares idóneos dentro de células específicas. Estos procesos probablemente requieren la intervención de otras proteínas, tales como el producto del gen *ric-3*. En el nemátodo *C. elegans* es necesaria la presencia de la proteína RIC-3 para la maduración de varios

subtipos de nAChRs. Sin embargo, ésta no es necesaria en la expresión de otros receptores ionotrópicos que se expresan en las mismas células. De forma parecida a lo ocurrido con RIC-3, su homólogo humano (hRIC-3) incrementa entre 5-10 veces la expresión de sitios de unión de α -bungarotoxina correspondientes a nAChRs homoméricos formados por subunidades $\alpha 7$, cuando los RNAs de ambas proteínas se coinyectan en ovocitos de *Xenopus laevis*. Por el contrario, hRIC-3 inhibe totalmente la expresión de nAChRs heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ y homoméricos de serotonina 5-HT₃. Actualmente, se están utilizando quimeras de subunidades $\beta 2$ - $\beta 4$ del nAChR y $\alpha 7$ -5-HT₃ así como proteínas truncadas de hRIC-3 para localizar las regiones de interacción que dan lugar a los efectos mencionados.

O 110

EVIDENCIA DEL EFECTO MODULADOR DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE LA UNIÓN NEUROMUSCULAR DEL ESFINTER URETRAL EXTERNO EN CONDICIONES DE PARCIAL BLOQUEO NICOTÍNICO

García-Pascual A^a, Costa G^a, Labadía A^a, Jiménez E^b, Triguero D^a, González-Herreros M^a, Rodríguez-Veiga E^c, González-Soriano J^c

^aDepartamento de Fisiología (Fisiología Animal), Universidad Complutense.

^bDepartamento de Física Aplicada, Universidad Complutense. ^cDepartamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Universidad Complutense. Madrid

El óxido nítrico (NO) actúa como neurotransmisor relajante del músculo liso uretral, pero su papel sobre el componente estriado voluntario de la uretra, no se conoce. Mediante inmunohistoquímica de fluorescencia se observó la presencia de actividad NO sintasa neuronal (nNOS) en nervios y ganglios intramurales del esfínter estriado de corderos hembras, donde colocaliza con colin-acetiltransferasa (Chat). La actividad nNOS fue también positiva en el sarcolema, concentrada en la unión neuromuscular. Mediante la medición de la producción de [C14]-L-citrulina, se detectó actividad NOS dependiente de calcio tanto en la fracción citosólica como particulada del esfínter externo. La actividad contráctil inducida por estimulación nerviosa selectiva *in vitro* no fue afectada por el tratamiento con un inhibidor no selectivo de la NOS (Nw-L-nitro-arginina, 10 mM). Sin embargo, el tratamiento con un inhibidor selectivo de la isoforma neuronal (propil-L-arginina, 0,1 mM) o con un inhibidor de la guanilato ciclasa (ODQ, 0,01 y 0,1 mM) originaron una clara potenciación de las respuestas contráctiles, solamente cuando se había realizado un bloqueo parcial de los receptores nicotínicos de la placa motora con d-tubocurarina. En conclusión, la nNOS parece tener un papel modulador de la transmisión colinérgica. Este efecto parece ser evidente en situaciones en que el proceso de neurotransmisión esté afectado.

Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (PM99-0053-C2-01 y PM99-0053-C2-02).

O 111

EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO CRÓNICO SOBRE MECANISMOS DE INSERCIÓN DE RECEPTORES AMPA EN MEMBRANAS DE HIPOCAMPO DE RATA

Martínez-Turrillas R, Frechilla D, Del Río J

Departamento de Farmacología, Universidad de Navarra. Pamplona

En estudios previos encontramos que el tratamiento crónico con desipramina (DMI) y paroxetina (PAR) aumentó el tráfico a membrana de subunidades del receptor AMPA en hipocampo de rata (Martínez-Turrillas et al, 2002). Un aspecto importante del proceso de inserción en membrana de dichos receptores es el estado de fosforilación de las subunidades GluR1 y GluR2/3, que a su vez modula sus interacciones con proteínas de la densidad postsináptica, determinantes de su anclaje. Hemos medido ahora los niveles de GluR1 fosforilada en Ser845 y en Ser831 en extractos de membranas de hipocampo de ratas tratadas durante

21 días con DMI o PAR (10 mg/kg) y sacrificadas 24 h tras la última administración. DMI indujo un descenso significativo de pGluR1-Ser831, mientras que PAR produjo un ligero descenso en los niveles de pGluR1-Ser845. Se analizó además por inmunoprecipitación el efecto crónico de DMI y PAR sobre la interacción de GluR1 con la proteína SAP97, relacionada con la inserción de receptores en la sinapsis, así como la unión de GluR2/3 con la proteína NSF, a la que se atribuye un papel en el tráfico de proteínas. El tratamiento con DMI originó un aumento significativo de la unión de GluR1 con SAP97, no observado con PAR. En cambio, ambos antidepressivos indujeron un moderado aumento del complejo GluR2/3-NSF. Estos resultados apoyan la hipótesis del efecto del tratamiento antidepressivo crónico sobre mecanismos de plasticidad sináptica. Financiado por MCYT, BFI2001-1602.

O 112

LA GALANINA MODULA LOS RECEPTORES Y1 DEL NEUROPÉPTIDO Y EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA

Díaz-Cabiale Z^a, Razani H^a, Seamari Y^a, Garrido R^a, Vela C^a, Rivera A^b, Martos F^c, Coveñas R^a, González-Barón S^a, Narváez JA^a

^aDepartamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga.

^bDepartamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

^cDepartamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga

La galanina (GAL) es un neuropéptido que participa en numerosas funciones centrales, sugiriéndose que su acción pudiera estar mediada a través de la modulación de otros neurotransmisores o neuropéptidos. Así se ha demostrado que la GAL antagoniza las respuestas cardiovasculares y de la ingesta inducidas por los agonistas Y1 del neuropéptido Y (NPY). El objetivo del trabajo ha sido estudiar mediante técnicas de autorradiografía si la GAL puede modular a los receptores Y1 del NPY en el núcleo arcuado (nArc) y en el núcleo del rafe dorsal (nRD), zonas donde coexisten ambos tipos de receptores. Para ello se analizó el ligado del agonista de los receptores Y1 [125I]-Leu31-Pro34-NPY (25 pM) en presencia o ausencia de diferentes dosis de GAL (0,3, 1 y 3 nM), utilizando además el antagonista específico de los receptores de la GAL M35 (1nM). En el nArc la GAL (3 nM) redujo el ligado del agonista Y1 en un 14% ($p < 0,01$), efecto que se observó en el nRD (48%; $p < 0,001$) pero a una dosis menor (GAL 0,3 nM). El efecto se bloqueó en presencia del M35 ($p < 0,05$). Ninguna de las otras dosis usadas fueron capaces inducir efecto alguno. Estos resultados demuestran que la GAL modula negativamente y de forma dosis dependiente el ligado de los receptores Y1 en el nArc y nRD. Estos resultados pueden ser relevantes para el estudio del control central de la ingesta o de los mecanismos centrales implicados de la depresión.

Este trabajo ha sido subvencionado por la DGI (BFI2001-1905).

O 113

DESPOLARIZACIÓN INDUCIDA POR GABA EN INTERNEURONAS RETINIANAS

De la Villa P^a, Varela C^a, Blanco R^b, Rivera L^c

^aDepartamento de Fisiología, Universidad de Alcalá. ^bServicio de Oftalmología, HGTIP, Universidad Autónoma de Barcelona. ^cDepartamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. Madrid

El GABA constituye uno de los neurotransmisores inhibitorios más ubicuos del sistema nervioso central, cuyo efecto inhibitorio viene determinado fundamentalmente por su acción sobre receptores de membrana, que permiten la difusión de Cl⁻ al interior de la célula. Se ha descrito que el GABA podría actuar como agente excitatorio durante fases precoces del desarrollo prenatal. El presente trabajo muestra que en retina de animales adultos, el GABA tiene un papel excitador. Se han realizado experimentos electrofisiológicos mediante técnica de patch-clamp en configuraciones de célula entera y parche perforado, sobre

células disociadas enzimáticamente de retina de mamíferos adultos. Se han estudiado los potenciales de equilibrio para Cl^- [ECI] ante la aplicación instantánea de GABA.

Las células horizontales de la retina presentan un ECI de -30 mV, lo que determina la acción despolarizante del GABA. Las células bipolares de la retina muestran un gradiente de Cl^- a lo largo de la célula, siendo su ECI de -15 mV en la región dendrítica y de -60 mV en su terminal axónica; a un potencial de membrana fisiológico (ca. -45 mV) el GABA induciría una despolarización en las dendritas y una hiperpolarización en su terminal axónica. Las células amacrin y ganglionares de la retina muestran un ECI próximo a -80 mV, siendo en este caso la acción del GABA hiperpolarizante. En retina de mamíferos adultos el GABA actúa como agente despolarizante o hiperpolarizante dependiendo del ECI celular.

O 114

POTENCIACIÓN DEL EFECTO DEL INHIBIDOR DE LA RECAPTACIÓN DE NORADRENALINA REBOXETINA POR LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTAGONISTA DEL ADRENOCEPTOR ALFA-2 RS79948. EVALUACIÓN MEDIANTE MICRODIÁLISIS CEREBRAL *IN VIVO*

Ortega JE, Fernández-Pastor B, Meana JJ

Departamento de Farmacología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

Los inhibidores selectivos de la recaptación de noradrenalina (ISRN) presentan actividad terapéutica como antidepresivos a través de un mecanismo que involucra el incremento del neurotransmisor a nivel sináptico. Este incremento de noradrenalina (NA) inducido por ISRN puede ser contrarrestado por la actividad tónica inhibitoria mediada por adrenoceptores alfa-2. Los niveles extracelulares de NA fueron evaluados simultáneamente a nivel somatodendrítico en el *locus coeruleus* (LC) y a nivel terminal en la corteza cingular (Cg) mediante microdiálisis cerebral *in vivo* en rata despierta. La administración del ISRN reboxetina (5 mg/kg IP) indujo un aumento de la NA tanto en el LC ($162 \pm 32\%$, $n=5$) como en la Cg ($166 \pm 26\%$, $n=4$). La dosis de 3 mg/kg IP incrementó la NA en el LC ($145 \pm 15\%$, $n=8$) sin modificarla en Cg. La administración del antagonista del adrenoceptor alfa-2 RS79948 ($0,1$ mg/kg IP) tras previa administración de reboxetina (3 mg/kg) potenció el incremento de NA en el LC ($210 \pm 44\%$, $n=5$) y aumentó la NA en Cg ($196 \pm 29\%$, $n=5$). El RS79948 ($0,1$ mg/kg) administrado solo no varió significativamente los niveles de NA en LC ni en Cg. Los resultados demuestran que el antagonista de los adrenoceptores alfa-2 RS79948 puede potenciar el incremento de los niveles de NA en áreas terminales inducido por la administración de antidepresivos ISRN. Financiado por MCyT (SAF 01/0553) y UPV/EHU. JEO y BFP son becarios predoctorales del MCyT y Gobierno Vasco, respectivamente.

O 115

EL GRADO DE LESIÓN DE LAS NEURONAS NIGROESTRIATALES DETERMINA LA ALTERACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN RATAS CON LESIÓN DE 6-OHDA

Ferrer B^a, Espejo FE^b, Giuffrida A^c, Rodríguez de Fonseca F^a

^aFundación Hospital Carlos Haya, Unidad de Investigación. Málaga.

^bDepartamento de Fisiología, Universidad de Sevilla. ^cDepartamento de Farmacología, Universidad de California. Irvine, USA.

La estimulación de los receptores cannabinoides CB1 mediante drogas como la marihuana produce importantes efectos sobre la actividad

motora tanto en humanos como en animales de experimentación. Este hecho se ve apoyado por la gran densidad de estos receptores en los ganglios basales. Numerosos estudios muestran la capacidad del sistema cannabinoide endógeno de alterar la funcionalidad de los principales sistemas de neurotrasmisión presentes en los núcleos que constituyen los ganglios basales, como el sistema dopaminérgico, el gabérgico y el glutamatérgico. Todas estas evidencias señalan al sistema endocannabinoide como una diana terapéutica en enfermedades del sistema motor extrapiramidal que cursan con trastornos motores como la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington, etc.

Para ahondar en la alteración del sistema endocannabinoide en estas enfermedades, analizamos los niveles de anandamida (AEA) en los ganglios basales en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson – animales con lesión de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales mediante 6-OHDA – y estudiamos la actividad de las enzimas limitante de la síntesis de anandamida, la N-aciltransferasa (NAT), y la enzima de degradación, la amido hidrolasa específica (FAAH). Nuestros resultados muestran que la lesión con 6-OHDA produce una disminución en los niveles de AEA en el estriado ipsilateral y disminuye la actividad NAT. Esta disminución es dependiente del grado de lesión y esta presente siempre en el lado ipsilateral. El hallazgo de una alteración del sistema cannabinoide endógeno dependiente del grado de lesión indica que la utilización de fármacos activos en el sistema cannabinoide en la enfermedad de Parkinson debería de realizarse de modo diferencial en cada estadio de evolución de la misma.

O 116

EFFECTOS DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE SOBRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES COLINÉRGICOS EN EL PROSENCÉFALO BASAL Y MESENCÉFALO DE RATA ADULTA

Gonzalo P^a, Arevalo J^b, Gonzalo-Ruiz A^a

^aLaboratorio de Neuroanatomía, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Valladolid, Campus Universitario de Soria.

^bHospital Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid

En este estudio se ha analizado el efecto del péptido β -amiloide en la expresión de receptores colinérgicos y su interacción con los sistemas colinérgico, gabérgico, serotoninérgico y noradrérgico en el prosencéfalo basal y mesencéfalo de la rata. En ratas (Wistar) se realizaron inyecciones del péptido $\text{A}\beta$ (1-40) en la corteza retrosplenial. Tras tiempos de supervivencia entre 4 días y dos semanas, los animales se sacrificaron y los cerebros se procesaron inmunocitoquímicamente para la demostración del depósito de $\text{A}\beta$, la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico, las subunidades m1 y m2 del receptor muscarínico, ChAT, GABA, serotonina, dopamina- β -hidroxilasa, parvalbumina (Parv) y calbindina. Inyecciones de $\text{A}\beta$ inducen modificaciones en la expresión de $\alpha 7$ y en la de m1 y m2, asociadas a somas y a sistemas de fibras del prosencéfalo basal, fundamentalmente en el núcleo de la banda diagonal de Broca. La disminución más significativa se ha apreciado en la expresión de $\alpha 7$. Mediante doble marcaje se ha observado que $\alpha 7$ y m2 se expresan en neuronas colinérgicas y en interneuronas, putativamente gabérgicas y Parv+, mientras que m1 se expresa principalmente en interneuronas. El depósito de $\text{A}\beta$ en corteza retrosplenial también induce una disminución en la expresión de $\alpha 7$, m1 y m2 en los núcleos del rafe y en el *locus coeruleus*. La disminución más importante se apreció en $\alpha 7$ asociada a neuronas de gran tamaño, putativamente serotoninérgicas y noradrérgicas, mientras que en células pequeñas, putativamente gabérgicas, se observó una ligera disminución en la expresión de $\alpha 7$. Financiación: FIS 01/0126.