

COMUNICACIONES PÓSTER

Glía

P 1

OPPOSITE EFFECTS OF LITHIUM IN NEURONS AND ASTROCYTES: STIMULATION AND INHIBITION OF THE MEK-ERK PATHWAY

Pardo R, Ramos B, Picatoste F, Claro E

Instituto de Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona

Exposure of cerebellar granule neurons to millimolar concentrations of lithium enhanced MEK and ERK phosphorylation in a concentration-dependent manner. In asynchronous, proliferating cortical astrocytes, lithium inhibited [3H]thymidine incorporation into DNA, induced a G2/M cell cycle arrest, and inhibited phosphorylation of MEK and ERK, but did not affect phosphorylation of Akt. In quiescent astrocytes, lithium inhibited cell cycle re-entry as stimulated by endothelin-1, and also prevented stimulation of MEK and ERK phosphorylation, but did not affect endothelin-1 or EGF activation of Ras. Lithium inhibition of the astrocyte MEK-ERK pathway was not due to inositol depletion, as it was not counteracted by exogenous addition of inositol. Treatment of astrocytes with compound SB-216763 resulted in the inhibition of Tau phosphorylation at Ser396, and the stabilization of cytosolic β -catenin, consistent with the inhibition of glycogen synthase kinase-3 β , but failed to reproduce lithium effects on MEK and ERK phosphorylation and cell cycle arrest. These opposing effects of lithium in neurons and astrocytes make lithium treatment a promising strategy to favor neural repair and reduce reactive gliosis after traumatic injury.

P 2

VULNERABILIDAD SELECTIVA FRENTE A LA ACCIÓN TÓXICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DERIVADOS DEL MERCURIO Y ESTAÑO EN CULTIVOS NEURONALES Y GLIALES

Cristòfol R, Gassó S, Vilchez D, Pertusa M, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C

Departamento de Farmacología y Toxicología, IIBB, CSIC-IDIBAPS. Barcelona

Metilmercurio, trimetilestaño y trietilestaño son contaminantes ambientales altamente neurotóxicos. En el presente trabajo se estudia la citotoxicidad de estos compuestos en cultivos primarios humanos de neuronas y astrocitos corticales, y en cultivos de neuroblastoma humano SH-SY5Y. A efectos comparativos, se ha analizado la toxicidad de estos compuestos en cultivos de células granulares de cerebelo y en neuronas hipocámpales de rata, dos áreas cerebrales diana para el metilmercurio y trimetilestaño, respectivamente. El estudio muestra la existencia de una vulnerabilidad selectiva según el tóxico, tipo celular y especie tras 24 h de exposición. Las neuronas hipocámpales de rata son las más sensibles al trimetilestaño (TC50= 1,4 μ M), mientras que las neuronas corticales humanas, astrocitos y células de neuroblastoma presentan una elevada resistencia a este neurotóxico, con valores de TC50> 300 μ M. Las neuronas de hipocampo de rata también son las más sensibles frente a los efectos del trietilestaño, pero el valor de TC50 (4,6 μ M) es sólo 3 veces inferior al de las neuronas humanas (14,7 μ M). De forma similar,

para el metilmercurio las células granulares de cerebelo de rata son unas 3 veces más sensibles que los astrocitos humanos (TC50= 2,5 y 8,1 μ M, respectivamente). Así, estos resultados revelan que el rango entre la máxima y mínima potencia citotóxica es mucho mayor para el trimetilestaño que para el trietilestaño y metilmercurio. Financiado por FIS 00/1094.

P 3

LA ACTIVACIÓN GLIAL MODULA LA NEUROTOXICIDAD DEL GLUTAMATO EN CULTIVOS DE NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO

Pérez-Capote K, Serratosa J, Solà C

Departamento de Farmacología y Toxicología, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-CSIC, IDIBAPS.

En presencia de daño neuronal, las células gliales experimentan cambios morfológicos y funcionales constituyendo lo que se denomina glía reactiva, pasando a producir una serie de moléculas relacionadas con procesos de neuroprotección o de neurodegeneración. Se cuestiona el papel nocivo o beneficioso de la glía reactiva para las neuronas. En este trabajo se ha estudiado la influencia de la presencia de glía quiescente o glía reactiva en la respuesta neuronal a un estímulo dañino. Se han utilizado cultivos neuronales y cultivos neurona-glía de cerebelo y se ha determinado el efecto de distintas concentraciones de glutamato (Glu) sobre la viabilidad neuronal en ausencia y en presencia del pretratamiento con el lipopolisacárido de *E. coli* (LPS), inductor de activación glial. Paralelamente, se han estudiado cambios inducidos en las células gliales en las diferentes situaciones experimentales a partir de la evaluación de cambios morfológicos y la producción de óxido nítrico. La presencia de células gliales protege de la neurotoxicidad del Glu dentro de un cierto rango de concentraciones, por encima del cual la presencia de glía es perjudicial para las neuronas. El pretratamiento con LPS incrementa el efecto tóxico del Glu en los cultivos neurona-glía. Estos resultados muestran la importancia del estado en que se encuentran las células gliales en la respuesta neuronal a un determinado estímulo. Financiación: CICYT (SAF 2001-2240). K. P-C. tiene una beca FPI del IDIBAPS.

P 4

ASTROCITOS DE HIPOCAMPO DE RATA EXPRESAN CANALES DE CALCIO VOLTAJE-DEPENDIENTES

Araque A, Perea G

Instituto Cajal, CSIC. Madrid

La existencia de canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes en astrocitos *in situ* es controvertida.

Utilizando técnicas de *patch-clamp* y de medida de Ca²⁺, hemos investigado la presencia de canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes en astrocitos de *stratum oriens* en rodajas de hipocampo de rata. Hemos encontrado:

- 1) Existen dos tipos de astrocitos: pasivos, de alta conductancia de membrana y relación I-V lineal; y complejos, de menor conductancia de membrana y compleja relación I-V.
- 2) La despolarización de astrocitos pasivos por pulsos de voltaje no modifica sus niveles de Ca²⁺ intracelular.

- 3) La despolarización de astrocitos complejos provoca aumentos de Ca^{2+} , cuya amplitud es función del voltaje aplicado.
- 4) Cd^{2+} extracelular suprime el incremento de Ca^{2+} , indicando que se debe al influjo de Ca^{2+} por canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes.
- 5) El aumento de Ca^{2+} es sensible a nifedipina y w-conotoxina GVIA, sugiriendo que está mediado por canales de Ca^{2+} de tipo L y N.
- 6) Registros de las corrientes macroscópicas muestran la presencia de distintas conductancias voltaje-dependientes (*inward rectifier*, Na^+ , *delayed rectifier*, etc.).
- 7) El bloqueo farmacológico de otras conductancias voltaje-dependientes revela la existencia de corrientes de entrada voltaje-dependientes sensibles a Cd^{2+} .

Concluimos que un tipo específico de astrocitos de hipocampo de rata poseen canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L y N.

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

P 5

ACCIONES DE LAS GLITAZONAS SOBRE LA VIABILIDAD DE ASTROCITOS Y GLIOMAS

Pérez-Ortiz JM, Vaquero CF, Domingo B, Molina F, Llopis J, Tranque P

Área de Fisiología, Facultad de Medicina, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla-La Mancha

PPARGgamma es un receptor nuclear con capacidad de regular el metabolismo energético y la respuesta inmune y que está presente en astrocitos. Las glitazonas son ligandos de PPARGgamma con acciones antidiabetogénicas y antiinflamatorias, que además afectan a la supervivencia de distintos tipos celulares. Sin embargo, no todas las acciones de las glitazonas están mediadas por PPARGgamma.

En el presente trabajo se abordan: 1) los efectos de dos glitazonas (rosiglitazona y ciglitazona) sobre la viabilidad celular de astrocitos de rata en cultivo primario y sobre las líneas de glioma C6 y U251; 2) la implicación de PPARGgamma en estos efectos; y 3) la participación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de la mitocondria.

Nuestros resultados muestran que en células de glioma C6 y U251 tanto la ciglitazona como la rosiglitazona (20 μM) causan pérdida de viabilidad celular y muerte por apoptosis, mientras que sólo la ciglitazona produce muerte celular en astrocitos. Además, a concentraciones más bajas (10 μM) que causan muerte en gliomas, la ciglitazona tiene un efecto protector sobre astrocitos. Tanto los astrocitos como las líneas de glioma expresan PPARGgamma (*Western blot*), pero los efectos descritos son independientes de este receptor. Estas glitazonas producen muerte de astrocitos y gliomas a través de la producción de ROS, y su aplicación aguda disminuye el potencial mitocondrial (TMRE).

P 6

INDUCCIÓN EN RATAS DE TUMORES CEREBRALES MEDIANTE INYECCION DE ETILNITROSUREA (ENU)

Bulnes S^a, Bengoetxea H^a, Gutiérrez E^b, Lafuente JV^a

^a Departamento de Neurociencias, Universidad del País Vasco (UPV-EHU).

^b Departamento de Enfermería I. Universidad del País Vasco (UPV-EHU)

El oligodendroglioma es un tumor de diagnóstico controvertido en la actualidad. La etilnitrosourea (ENU) ha demostrado su utilidad en la inducción transplacentaria de oligodendrogliomas medulares. Nuestro objetivo es comprobar el rendimiento de este modelo para producir gliomas intracerebrales.

Se inyectan tres hembras Sprague Dawley con 80 mg/kg PC de ENU intraperitonealmente en el día quince de gestación.

Se realiza una HE y el estudio inmunofenotípico del tumor con: GFAP, Ki-67, GLUT-1, EBA y S-100 e histoquímica para butirilcolinesterasa y LEA. La incidencia tumoral en el SNC a partir del 4.º mes de

desarrollo postnatal de la rata es del 81%. Inyecciones reiteradas de ENU a madres de la misma generación aumenta la incidencia tumoral por camada y disminuye el tiempo de aparición tumoral. Se dan dos tipos tumorales: intraparenquimatosos (oligodendrogliomas) y extraparenquimatosos (schwanomas malignos).

El desarrollo tumoral comienza con una proliferación oligodendroglial principalmente periventricular y según progresa la edad encontramos tumores de mayor tamaño y rasgos de agresividad, localizados en sustancia blanca subcortical, llegando a invadir los ventrículos, corteza y esporádicamente en estructuras de la base del encéfalo. Los schwanomas malignos comienzan en el nervio trigémino y al progresar envuelven el cerebro diseminándose por las cubiertas meníngicas y por los espacios perivascuales, ocasionalmente infiltran el parénquima cerebral.

P 7

INDUCCIÓN DE GADD153 EN ASTROCITOS TRAS PRIVACIÓN DE OXÍGENO Y GLUCOSA

Santos P, Miquel MI, Benavides MA, González-García C, Ceña V, Calvo S

Centro Regional de Investigaciones Biomédicas,

Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete

Mediante estudios de *differential display* de mRNA de astrocitos sometidos a privación de oxígeno y glucosa, hemos demostrado que la expresión de gadd153 aumenta intensa y precozmente. El análisis por northern blot y por PCR cuantitativa a tiempo real indica que los niveles de gadd 153 aumentan 8 veces a las 2 horas, 21 veces a las 4 horas y luego caen, recuperando los niveles mínimos iniciales a las 24 horas tras el periodo isquémico. La proteína Gadd153, analizada por *Western blot* y por inmunocitoquímica, sigue el mismo curso temporal que el RNA y se localiza exclusivamente en el núcleo, alcanzando el máximo nivel a las 8 horas y disminuyendo posteriormente.

El gadd153 se ha relacionado en muchas ocasiones con la respuesta de estrés del retículo endoplásmico hasta el punto de que la presencia de gadd153 se acepta como signo de que existe este estrés. Para ver si la privación de oxígeno y glucosa estaba produciendo esta respuesta de estrés en el retículo endoplásmico analizamos los niveles de expresión de grp78, un chaperón del retículo que se expresa siempre que hay una situación de estrés como es el acúmulo de proteínas no plegadas o el vaciamiento de los depósitos de calcio. La expresión de gadd es paralela a la expresión de bip lo que indica que la privación de oxígeno y glucosa está produciendo una respuesta de estrés del retículo endoplásmico en los astrocitos

Financiado, en parte, por los proyectos BFI2001-1565 del MCYT; G03/167 Min. 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 SAF2001-0760 de la CICYT a S.C. AB es becaria CRIB de JCCM. PS es becario de MCYT.

P 8

PAPEL DE LAS POLIAMINAS EN LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR CÉLULAS GLIALES EN CULTIVO

Camón L^a, Tusell JM^b, Serratosa J^a, Martínez E^b

^a Departamento de Farmacología y Toxicología, IIBB (CSIC-IDIBAPS).

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

Las poliaminas (PA), putrescina (PUT), espermidina (SD) y espermina (SM) tienen numerosas funciones en el desarrollo y mantenimiento de los seres vivos. En el proceso de lesión aguda del SNC se produce una rápida muerte neuronal que se acompaña de cambios gliales y de la desregulación del metabolismo de las PA. Por una parte, las modificaciones poliaminérgicas se han relacionado con la activación glial y, por otra se ha descrito que las poliaminas pueden regular el metabolismo del óxido nítrico (NO).

Nuestros estudios, haciendo uso de cultivos mixtos de astrogliá y microglía de cortex de rata y de inhibidores de las enzimas responsables de la síntesis de las PA como la alfa-difluorometilornitina, el metilglioxal-bis[guanilhidrazona] (MGBG) y el MDL-75257, indican que las poliaminas están asociadas a la producción de NO por las células gliales. El MGBG es el inhibidor más eficaz en modificar la producción de nitritos inducida por LPS (0,1 µg/mL). Su efecto inhibitorio es concentración-dependiente y revierte por la adición de SM, hecho que indica su especificidad.

En conclusión, los datos obtenidos muestran que la modificación del metabolismo de las PA es capaz de modular la producción de mediadores inflamatorios gliales como el NO. Ello sugiere que las alteraciones poliaminérgicas podrían contribuir al progreso o a la recuperación de la lesión en el SNC mediante la modulación de la funcionalidad glial. Realizado con la ayuda del proyecto SAF2001-1643 (CICYT).

P 9

ALTERACIONES EN LA FORMACIÓN DE GMP CÍCLICO DEPENDIENTE DE NO EN ASTROGLÍA TRAS EL TRATAMIENTO A CORTO Y LARGO PLAZO CON ÉSTERES DE FORBOL

Baltrons MA, Pifarré P, García A

Instituto de Biotecnología y Biomedicina V. Villar Palasí y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona

Previamente hemos demostrado que el tratamiento de astrogliá de rata con agentes inflamatorios inductores de la NO sintasa (LPS, IL-1β), produce una disminución de la guanilil ciclasa soluble (sGC), receptor fisiológico del NO. Este efecto es revertido por estaurosporina, inhibidor de proteína quinasas C (PKCs) y otras serina/treonina quinasas. Con el objeto de estudiar la posible implicación de PKCs en la regulación de la sGC, en el presente trabajo hemos examinado el efecto de la exposición a un activador de PKCs, el éster de forbol PMA (100 nM), sobre la formación de GMP cíclico (cGMP) estimulada por NO en astrogliá de rata en cultivo. El PMA presenta un efecto bifásico, produciendo una rápida disminución de la acumulación de cGMP (45-55 % a los 5 min), seguida de una recuperación de los niveles control después de 6 h y una posterior disminución (60%) con tratamientos de más de 20 h. La actividad sGC medida en homogenados sigue un patrón de inhibición semejante. A los 15 min el efecto del PMA es bloqueado por inhibidores de PKCs, mientras que el efecto a largo plazo lleva consigo una disminución de la subunidad β1 de la sGC y requiere transcripción y síntesis de proteínas. A tiempos largos de tratamiento también parece afectada la velocidad de degradación del cGMP ya que la disminución de la acumulación de cGMP producida por el PMA es mayor en ausencia (90%) que en presencia de un inhibidor de fosfodiesterasas. En contraste, el PMA no afecta a la formación de cGMP estimulada por NO en neuronas granulares de cerebelo. Financiado por SAF2001-2540 y SGR2001-212.

P 10

DESARROLLO DE LA MICROGLÍA EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINA EMBRIONARIA DE CODORNIZ

Marín-Teva JL, Tassi M, Cuadros MA, Calvente R, Sánchez-López AM, Navascués J

Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

Células microgliales ameboides entran en la retina embrionaria de codorniz a través de la zona de inserción del nervio óptico a partir del séptimo día de incubación (E7). Estas células se extienden por toda la superficie vítrea de la retina mediante migración tangencial y colonizan las capas plexiformes interna y externa mediante migración radial en dirección vitreoscleral (a partir de E9). En las capas plexiformes, las células microgliales se diferencian mediante ramificación. Hemos estudiado el desarrollo de la

microglía en cultivos organotípicos de explantes de retinas de E9, antes de que las células microgliales ameboides comiencen a migrar radialmente, y E15, cuando muchas células microgliales se han ramificado en las capas plexiformes. En cultivos de explantes de E9, las células microgliales no parecían activarse y conservaban inicialmente su carácter ameboides y su localización vítrea. Posteriormente, migraban radialmente hacia las capas plexiformes, donde se ramificaban. Este desarrollo de las células microgliales era similar al observado *in situ*. En cultivos de explantes de E15, las células microgliales ramificadas de las capas plexiformes se activaban rápidamente y migraban a la parte vítrea de la retina. Posteriormente, migraban de nuevo a las capas plexiformes, donde se ramificaban. En consecuencia, los cultivos de retinas de E9 y E15 constituyen excelentes modelos experimentales para el estudio de los procesos de migración, ramificación y activación microglial.

P 11

MODIFICACIONES EN LA ORGANIZACIÓN GLIAL DE LA RETINA DE RATONES PCD

Marchena M, Velasco A, Cid E, Lara JM, Aijón J

Dpto. de Biología Celular y Patología, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca

Los ratones con la mutación *pcd* (*Purkinje cell degeneration*) sufren una neurodegeneración progresiva, lenta y tardía comparable a la retinosis pigmentaria humana. Como en esta enfermedad, los síntomas se evidencian en la segunda mitad de la vida, de manera progresiva e irreversible se altera la estructura y funcionalidad de la retina originando inicialmente una pérdida selectiva de fotorreceptores.

Si bien los patrones de degeneración de fotorreceptores en este modelo animal están ampliamente documentados, los datos relativos a las alteraciones de la población glial son escasos. En este trabajo analizamos las modificaciones de las poblaciones gliales de la retina desde estadios precoces de la neurodegeneración (60 días postnatales) hasta edades caracterizadas por un avanzado estado de deterioro funcional y estructural de la retina (270 días posnatales).

Mediante el empleo combinado de marcadores inmunocitoquímicos, como glutamina sintetasa, proteína ácida fibrilar glial, calretinina, calbindina, parvalbúmina y S100, describimos la progresiva alteración de los patrones de distribución y reactividad de las células de Müller. Además, mediante histoquímica para lectina de tomate y nucleótido difosfatasa e inmunohistoquímica para detectar la proteína CD45, describimos la progresiva alteración de la población microglial y su posible relación con la neovascularización de la retina externa. Financiado por Junta de Castilla y León (SA067/03) y FISS (PI021730).

P 12

ORGANIZACIÓN GLIAL DE LA CABEZA DEL NERVIO ÓPTICO DE UN CIPRÍNIDO ADULTO

Lara J, Velasco A, Cid E, Marchena M, Aijón J

Dpto. Biología Celular y Patología, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca

Este trabajo exponemos las peculiaridades de la organización glial de la cabeza del nervio óptico de un ciprínido, la tenca (*Tinca tinca*), mediante análisis inmunocitoquímico y ultraestructural.

Se emplean anticuerpos específicos para células macrogliales, como glutamina sintetasa (GS), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y S100. Utilizamos el anticuerpo N518 como marcador de los nuevos axones originados de manera continuada en la retina de peces y el anticuerpo anti-antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para identificar células proliferativas.

Demostremos una adaptación regional de los procesos vitreales de las células de Müller en las proximidades del disco óptico (GS+ y S100+), intensamente marcadas además con anti-GFAP. En contacto

con estos procesos vitreales aparecen astrocitos marcados con anti-S100 y células S100— identificadas ultraestructuralmente como microglía. Además, en el límite entre la retina y el nervio óptico, en una región homóloga al tejido intermedio de Kuhnt de mamíferos, se localiza una población de células PCNA+ caracterizadas como glioblastos. Por último, en la porción intraocular del nervio óptico aparecen oligodendrocitos en diferenciación dispuestos en hileras. Tanto los glioblastos como estas células en diferenciación pueden ser utilizadas como fuente de elementos gliales en el crecimiento continuado de la vía visual de este tipo de vertebrados. Financiado por la Junta de Castilla y León (SA067/03).

P 13

CARACTERIZACIÓN DE LA PARED DE LOS VENTRÍCULOS LATERALES DE BOVINOS ADULTOS. EVIDENCIAS DE NEUROGÉNESIS

Rodríguez-Pérez LM, Pérez-Martín M, Pérez-Figares JM, Fernández-Llebrez P

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

La neurogénesis en el sistema nervioso central (SNC) adulto es un proceso restringido a regiones con un microambiente especial como las paredes de los ventrículos laterales (VL) y el hipocampo. La arquitectura de estas regiones es bien conocida en roedores pero sólo parcialmente en otros mamíferos. Hemos estudiado *in vivo* e *in vitro* las características morfológicas e inmunocitoquímicas de las regiones neurogénicas bovinas. En la pared del estriado se detectó mayor número de núcleos marcados con anti-PCNA. Sólo en esta zona, el epéndimo (EP) se marcaba con anticuerpos contra GFAP, BLBP y nestina y presentaba largas prolongaciones basales. El subepéndimo, estaba constituido por numerosas células pequeñas anti-βIII tubulina (+) y anti-NSE (–) siendo consideradas como neuroblastos. Bajo esta capa, una red glial GFAP positiva albergaba neuroblastos bipolares con capacidad migratoria de acuerdo a resultados *in vitro* usando el marcador DiI. Se obtuvieron explantes de las paredes de los VL formados por EP y algunas células subependimarias, pero no astrocitos. Al cultivarlos en medio libre de suero y factores de crecimiento, las células subependimarias proliferan intensamente a la vez que el EP adquiere morfología y marcadores característicos de glía radial. La mayor parte de las células producidas en el explante son neuroblastos, que sintetizan IGF-1 que es usado por ellos mismos como un factor de supervivencia. Financiaci3n: BFI 2000-1360; FIS 01/0948; Red Cien, Instituto de Salud Carlos III; Servicio Andaluz de Salud.

P 14

PERMEABILIDAD DE LAS PAREDES VENTRICULARES PROXIMAS DE BARRERA EPENDIMARIA O BARRERA ASTROGLIAL, EN ANIMALES HIDROCEFÁLICOS

Páez P^a, Roales-Buján R^a, Rodríguez S^b, Jiménez AJ^a, Rodríguez E^b, Pérez-Figares JM^a

^aDepartamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, España. ^bInstituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral, Chile

Las células endimarias recubren las cavidades ventriculares del SNC, constituyendo la barrera cerebro-LCR. Estas células carecen de capacidad regenerativa y su daño, experimental o patológico, provoca un proceso de reacci3n astrogliar que culmina con la formaci3n de una nueva barrera que tapiza la superficie ventricular dañada. Las propiedades de la barrera astrogliar se desconocen, y su dilucidaci3n es relevante al ser dicha barrera la que opera en ciertas zonas ventriculares durante el desarrollo de la hidrocefalia. La permeabilidad que presentan las barreras endimaria y astrogliar a ciertas moléculas se ha estudiado en ratones los mutantes *hyh*. Estos desarrollan una hidrocefalia congénita

y una p3rdida progresiva de la capa endimaria, que se inicia durante la etapa embrionaria y que continua postnatalmente. El estudio se realiz3 administrando en el LCR ventricular peroxidasa de rábano e IgG de conejo y estudiando su penetraci3n en el tejido nervioso pr3ximo a las zonas con barrera endimaria o con barrera glial. Ambos compuestos fueron rastreados mediante inmunocitoquímica con anticuerpos específcos. Los resultados muestran diferencias en la capacidad de penetraci3n de la peroxidasa y de la IgG en el parénquima nervioso dependiendo de la existencia de epéndimo o de barrera glial, indicando que la permeabilidad de ambas barreras es cualitativamente diferente. Financiaci3n: FIS 01-0948; Red Cien, Instituto de Salud Carlos III, Servicio Andaluz de Salud; FONCEDECYT (Chile).

P 15

CARACTERIZACIÓN DE LA GLÍA POSITIVA A NADPH-DIAFORASA DEL NERVIO ÓPTICO DE LA TENCA DURANTE SU DEGENERACIÓN/REGENERACIÓN

Clemente D, Arenzana FJ, Porteros A, Aij3n J, Ar3valo R

Departamento de Biología Celular, Universidad de Salamanca

Una subpoblaci3n de la glía del nervio óptico (NO) de la tenca posee actividad NADPH-diaforasa (ND), marcador de células productoras de óxido nítrico, cuyo papel en la regeneraci3n nerviosa es controvertido. En animales control se observan dos tipos celulares positivos a ND (tipos I y II) en la porci3n prequiasmática del NO y un tercero (tipo III) en la postquiasmática. Tras la secci3n del NO detectamos dos nuevos tipos celulares en la porci3n prequiasmática (tipos IV y V), la desaparici3n de las células de tipo I, la activaci3n de las células de tipo III y un incremento significativo del número total de células positivas a ND. Para la caracterizaci3n de los cinco tipos celulares llevamos a cabo experimentos de doble marcaje de ND con S-100, GFAP, vimentina y glutamina sintetasa (GS) (marcadores astrocitarios) y con lectina de tomate (Lec) (marcador microglial) en el NO control y seccionado. Los cinco tipos de células gliales positivos a ND son positivos a S-100 y ninguno de ellos se marca con GFAP ni Lec. Todas las células de tipo III y subpoblaciones de las de tipo I, II, IV y V son positivas a GS. Las células de tipo I, II, III y IV no expresan vimentina. Sin embargo, las de tipo V muestran tinci3n para vimentina en el núcleo. Estos resultados sugieren que todos los tipos celulares positivos a ND del nervio óptico de la tenca son de naturaleza astrocítica, siendo los tipos celulares IV y V el resultado de la activaci3n de las células de tipo I en respuesta a la lesi3n.

P 16

RELACI3N ENTRE LA EXPRESI3N DE RECEPTORES COLINÉRGICOS Y DE GLUTAMATO Y LA ACTIVACI3N DE CÉLULAS GLIALES INDUCIDA POR EL PÉPTIDO β-AMILOIDE

González I^a, Sanz JM^b, Gonzalo-Ruiz A^a

^aLaboratorio de Neuroanatomía, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Valladolid, Campus Universitario de Soria. ^bLaboratorio de Anatomía Patológica, Hospital Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá de Henares. Madrid

En el presente estudio se ha evaluado la implicaci3n de receptores colinérgicos y de glutamato en la reacci3n inflamatoria que se produce ante una lesi3n experimental tóxica, determinada por la inyecci3n del péptido β-amiloides en la corteza cerebral de la rata. Tras periodos de entre 4 días y dos semanas, los animales se sacrificaron y los cerebros se procesaron para la demostraci3n del depósito de Aβ, GFAP, microglía, iNOS, subunidades GluR1 y GluR2/3 del receptor AMPA, subunidades NR1 y NR2a/b del receptor de NMDA, la subunidad α7 del receptor nicotínico y la m1 del muscarínico. A nivel de la lesi3n se observa una hipertrofia astrocitaria y un incremento de la actividad de células microgliales, que también expresan iNOS. La expresi3n de GFAP está aumentada en la periferia del depósito,

mientras que la activación de microglia y la expresión de iNOS se observa infiltrando a depósitos de A β . Asimismo, la inyección de A β induce un incremento de la expresión de α 7 y de GluR1 en asociación a depósitos de A β y a la proliferación de astrocitos, mientras que la activación de células de microglia se ha encontrado asociada principalmente a la expresión de GluR1 y NR2a/b. Estos resultados sugieren que la proliferación de células gliales, asociadas a depósitos de A β , poseen receptores funcionales cuya activación podría desempeñar un papel importante en los procesos de neurodegeneración.

Financiación: FIS 01/0126.

P 17

CÉLULAS DE MICROGLÍA Y ASTROGLÍA EN EL MODELO DE CHOQUE ENDOTÓXICO PRENATAL

Ribó D^a, Romero E^b, Acarín L^a, González B^a, Borrell J^b, Castellano B^a

^a Unidad de Histología, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Barcelona.

^b Grupo de Neuroinmunología, Instituto Cajal, CSIC. Madrid

El modelo de choque endotóxico prenatal (Borrell et al, Neuropsychopharmacology 2002; 26: 204-15) reproduce alteraciones en los mecanismos implicados en el procesamiento de la información sensorimotora similares a la esquizofrenia. Para el estudio glial se han usado encéfalos de ratas macho Wistar de 170 días cuyas madres han sido expuestas a choque endotóxico mediante administración subcutánea de LPS (2 mg/kg/día) durante la gestación. Se han procesado secciones de criostato para la demostración inmunohistoquímica de GFAP y vimentina para astrocitos e histoquímica de la lectina de tomate para microglia. Nuestras observaciones revelan ligeras alteraciones en ciertas regiones preferentemente en astrocitos. Éstos, en relación al cíngulo, fimbria y cápsula interna muestran un cierto grado de reactividad caracterizada por un ligero incremento de GFAP y vimentina. El cuerpo calloso muestra un incremento progresivo hacia niveles caudales. En sustancia gris (córtex cingulado) hay un incremento de GFAP pero no una expresión *de novo* de vimentina. En el hipocampo, además, muestran alteraciones en su distribución. Estos cambios son más aparentes en las zonas ocupadas por las fibras musgosas.

En conclusión, los cambios morfológicos encontrados son sutiles y difieren de la reactividad glial que generalmente observamos en procesos neurodegenerativos.

Agradecimientos a M.A. Martil por su excelente ayuda técnica.

Financiación: FIS (01/1138), Fundació Marató TV3 (014931) y C. de Madrid (08.5/0020/2001).

P 18

LA GLÍA ENVOLVENTE OLFATORIA DE ROEDOR, PERO NO LA DE PRIMATE, ENTRA EN SENESCENCIA TRAS PERÍODOS CORTOS EN CULTIVO

Rubio MP, Muñoz-Quiles C, Ramón-Cueto A

Laboratorio de Regeneración Neural, Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC

Los trasplantes de glía envolvente olfatoria (OEG) p-75 positiva promueven la reparación de médulas espinales lesionadas de roedor. Para obtener más OEG hemos alargado su periodo de cultivo. A partir de la tercera semana estas células entran en senescencia mostrando cambios fenotípicos, intensa actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia, y disminución en la expresión de p-75. Así, de un bulbo sólo se obtienen 0,3 millones de OEG óptima para trasplante. En la sexta semana la OEG dejó de dividirse habiendo experimentado 3-4 duplicaciones poblacionales (PDs).

Por el contrario, la OEG de primate adulto no mostró ningún cambio tras periodos largos de cultivo (2,5 meses) ni tras congelación/descongelación. En 2,5 meses presentó más de 13 PDs, continuó expresando p75 y

mostrando un fenotipo no senescente. Por tanto, un solo bulbo olfatorio produce 1,5-2 millones de OEG en 10 días, y 25.000 millones en 2,5 meses. Esto permite disponer de células óptimas para trasplante autólogo, heterólogo, bien en la fase aguda como crónica de la lesión, y para almacenamiento en bancos de células.

En conclusión, para trasplante en roedores deben usarse cultivos jóvenes de OEG para garantizar sus propiedades y su actividad reparadora. En primates, la OEG cultivada durante periodos largos constituye una fuente segura de células para su uso en la terapia de las lesiones del sistema nervioso.

Financiado por Junta de Castilla y León, Comunidad de Madrid, Fundación IRSN y Fundación La Caixa.

P 19

ESTUDIO FUNCIONAL E HISTOLÓGICO DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LA MÉDULA ESPINAL LESIONADA DESPUÉS DEL TRASPLANTE DE GLÍA ENVOLVENTE DEL BULBO OLFATORIO

López-Vales R, García-Álías G, Forés J, Navarro X, Rodríguez FJ, Verdú E

Grupo de Neuroplasticidad y Regeneración, Instituto de Neurociencias,

Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Medicina,

Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona

El presente trabajo estudia mediante pruebas funcionales, electrofisiológicas e inmunohistoquímicas el efecto del trasplante de glía envolvente del bulbo olfatorio en la médula espinal lesionada sobre la expresión de COX-2, iNOS, IL-1 y VEGF durante los primeros 14 días poslesión. Los resultados funcionales muestran que el grado de deambulación, valorado por la escala BBB, el máximo ángulo del plano inclinado, y las amplitudes de los potenciales evocados motores y somatosensoriales fueron significativamente superiores en el grupo con trasplante glial que en el grupo control. El área de médula espinal preservada, el número de infiltrados lectina-positivos en la cavidad, y el grado de reactividad de COX-2, VEGF, iNOS e IL-1 fueron significativamente superiores en el grupo con trasplante glial que en el control durante la primera semana postlesión. En el grupo con trasplante glial también se observó un mayor número de perfiles vasculares en la sustancia gris medular respecto al grupo control. En ambos grupos se observó co-expresión de GFAP con IL-1 y VEGF, mientras que sólo se detectó co-expresión GFAP/COX-2 en el grupo con trasplante glial. En ambos grupos se observó co-expresión de lectina e iNOS. Estos resultados indican que el trasplante de glía envolvente causa un aumento de la inmunoreactividad a enzimas y citoquinas proinflamatorias pero con una mayor preservación de función y de parénquima medular.

Desarrollo y plasticidad

P 20

FOSFORILACIÓN DE LA SUBUNIDAD D DEL RECEPTOR COLINÉRGICO POR LA PROTEÍNA KINASA C- DURANTE LA ELIMINACIÓN SINÁPTICA POSNATAL EN LA SINAPSIS NEUROMUSCULAR

González CM^a, Lanuza MA^a, García N^a, Santafé MM^a, Nelson PG^b, Tomás J^a

^a Unitat d'Histologia i Neurobiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili. Reus, Tarragona, España.

^b Section on Neurobiology, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, USA

Hemos descrito un período crítico dependiente de la actividad de la proteína kinasa C (PKC) durante el proceso de eliminación sináptica posnatal que viene definido por la pérdida de axones y reorganización de los receptores

colinérgicos (AChRs) postsinápticos. También, hemos identificado PKC- θ mediante inmunofluorescencia confocal en la sinapsis neuromuscular. Puesto que la PKC- θ está regulada en el período posnatal en el músculo en desarrollo, hemos estudiado la maduración de la sinapsis neuromuscular y la eliminación sináptica en ratones *knockout* para la PKC- θ , y para ello, se ha teñido inmunocitoquímicamente el músculo *levator auris longus* para la detección simultánea de axones y AChRs. Los animales que no expresan PKC- θ manifiestan retraso en la maduración de los agregados de AChRs (la aparición de áreas libres de AChRs por desestabilización de ciertos receptores está retardada) así como un bloqueo inicial en el proceso de eliminación sináptica. Si PKC- θ desempeña un papel en este proceso de eliminación por afectar la estabilidad de los AChRs, la subunidad δ de los receptores podría ser el objetivo de su actividad fosforiladora. Mediante el uso de anticuerpos fosfo- y subunidad específicos capaces de reaccionar con las formas fosforiladas y no fosforiladas de la subunidad δ de los receptores colinérgicos, hemos observado una deficiente fosforilación de esta subunidad en los animales *knockout in vivo*.

P 21

POTENCIACIÓN Y DEPRESIÓN SINÁPTICAS MODULADAS POR AUTORRECEPTORES MUSCARÍNICOS ASOCIADOS CON CANALES DE CALCIO DURANTE LA SINAPTOGÉNESIS NEUROMUSCULAR

Salon I^a, Santafé MM^a, García N^a, Lanuza MA^a, Uchitel OD^b, Tomàs J^a

^aUnitat d'Histologia i Neurobiologia (UHN), Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili. Reus, Tarragona, España. ^bLaboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina

Hemos estudiado el efecto de agentes muscarínicos sobre potenciales evocados (EPPs) en sinapsis neuromusculares mono y doblemente innervadas de ratas posnatales. En las sinapsis dobles, la respuesta a los agentes muscarínicos de la terminación nerviosa que genera el potencial postsináptico mayor consiste en una inhibición de la liberación de acetilcolina por antagonistas M1 (pirenzepina y MT-7) así como por antagonistas M2 (methoctramina y AF-DX 116). La terminación nerviosa que genera el potencial postsináptico menor también es inhibida por los antagonistas muscarínicos M2. Sin embargo, el potencial sináptico menor es potenciado por los antagonistas M1. Así mismo, antagonistas selectivos del receptor muscarínico de tipo M4 (tropicamida y MT-3) también potencian a la terminación nerviosa que genera el potencial postsináptico menor. Hemos observado un cambio desde la implicación multicanal (tipos P/Q, N y L de canales de calcio operados por cambios de voltaje) en todas las respuestas a los agentes muscarínicos de la terminación nerviosa que genera el potencial postsináptico menor, a la implicación monocanal (tipo P/Q) de las respuestas en las sinapsis más maduras y monoinnervadas. En conclusión, autoreceptores muscarínicos (M1, M2 y M4) pueden potenciar o deprimir selectivamente (por su asociación diferencial con canales de calcio P/Q, N y L) la actividad sináptica de diferentes terminaciones nerviosas en sinapsis neuromusculares multinervadas durante el desarrollo.

P 22

CAMBIOS EN LA SINAPSIS NEUROMUSCULAR INDUCIDOS POR LA APLICACIÓN LOCAL CRÓNICA DE UN ANTICUERPO IgM MONOCLONAL CONTRA LA REGIÓN TERMINAL DE GANGLIÓSIDOS GM2, GalNAc-GD1a Y GalNAc-GM1b

Sabaté M, Santafé MM, Ortiz N, García N, Lanuza MA, Tomàs J
Unitat d'Histologia i Neurobiologia (UHN), Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili. Reus, Tarragona

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que se expresan en la membrana celular y representan los sialoglicoconjugados predominantes en el sistema

nervioso de los mamíferos. Autoanticuerpos antigangliósido han estado relacionados con los síndromes de Guillain-Barré y de Miller-Fisher, sin embargo, no se ha encontrado un papel neurobiológico claro para los gangliósidos. Se ha evidenciado que en ratones *knockout* que no expresan gangliósidos complejos existen cambios de degeneración-regeneración en sus axones motores y células de Schwann. En un estudio previo, hemos mostrado una relación entre gangliósidos y canales de calcio, dada la implicación del canal del tipo P/Q en el efecto agudo de una IgM anti-GM2 monoclonal de un paciente sobre la liberación de acetilcolina. En este estudio se evalúa el efecto crónico de la aplicación local de este anticuerpo monoclonal: 1) mediante técnicas de inmunomarcaje se ha identificado con precisión su localización neuromuscular; 2) con microscopía electrónica se han evaluado la afectación de la mielina de los axones motores y de la placa neuromuscular; 3) mediante técnicas de electrofisiología de registro intracelular se ha evaluado la neurotransmisión y la estequiometría de canales de calcio implicados. Se concluye que la presencia crónica de este anticuerpo puede reproducir en el animal experimental un modelo de la afectación muscular del paciente por la inducción de cambios de desconexión-regeneración en las sinapsis neuromusculares.

P 23

RECUPERACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE DISPARO Y SINAPSIS AFERENTES EN NEURONAS CENTRALES AXOTOMIZADAS PROVISTAS CON UNA NUEVA DIANA

Benítez-Temiño B, Pastor AM, De la Cruz RR

Departamento de Fisiología y Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

La axotomía produce cambios irreversibles electrofisiológicos y estructurales en neuronas del SNC posiblemente debido al fracaso regenerativo. En este trabajo comprobamos si la reconexión con una nueva diana restaura el fenotipo normal en neuronas centrales. Para ello se seccionó el fascículo longitudinal medial en gatos adultos con objeto de axotomizar las neuronas internucleares (Ints) del núcleo del motor ocular externo y se implantó en el sitio de lesión tejido embrionario cerebeloso en E15.

El registro crónico de la actividad unitaria de las Ints mostró un decremento de la frecuencia de disparo tras la axotomía, con una pérdida adicional de las señales tónica y fásica relacionadas con el movimiento ocular. Sin embargo, en los animales con implante estas neuronas mostraron propiedades de disparo similares a los controles. El estudio ultraestructural mostró un número reducido de botones axosomáticos sobre las Ints lesionadas, mientras que tras el implante la densidad de sinapsis aferentes se recuperó. El trazado anterógrado con biocitina reveló un crecimiento notable de los axones seccionados de las Ints que invadieron el implante y se ramificaron por todas las capas de la corteza cerebelosa, donde contactaron con distintos elementos celulares. En conjunto, estos datos indican que la reinervación de una nueva diana recupera las propiedades de disparo y la sinaptología de neuronas centrales axotomizadas. Financiado por FIS y Fundación Eugenio Rodríguez Pascual.

P 24

LA PROGESTERONA Y SUS METABOLITOS, DIHIDROPROGESTERONA Y TETRAHIDROPROGESTERONA, EVITAN LA MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR ÁCIDO KÁINICO EN EL GIRO DENTADO DE HIPOCAMPO DE RATA

Ciriza I^a, Azcoitia I^b, García-Segura LM^a

^aInstituto de Neurociencias Ramón y Cajal, CSIC. Madrid. ^bDepartamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid

La progesterona (PROG), además de su papel como hormona ovárica, se sintetiza en el sistema nervioso central y periférico a partir del colesterol. En el sistema nervioso, la PROG se metaboliza a dihidroprogesterona

(DHP) y tetrahidroprogesterona (THP). Nuestro objetivo en este trabajo ha sido estudiar el efecto tanto de la PROG como de sus metabolitos, DHP y THP, sobre la supervivencia neuronal del hipocampo después de la administración sistémica del ácido kainico (KA). Ratas Wistar hembra ovariectomizadas recibieron una primera inyección intraperitoneal de PROG (2,5 mg/kg), THP (2-8 mg/kg) y DHP (0,25-2 mg/kg) o vehículo, seguida de una inyección de KA (7 mg/kg) o vehículo. Una semana después de los tratamientos los animales fueron fijados por perfusión. El número de neuronas del hilus del giro dentado se determinó utilizando el método del disector óptico. La administración de KA provocó una pérdida significativa de neuronas del hilus comparada con la del grupo control (20.211 ± 611 neuronas/mm³ en el grupo control y 9.814 ± 1116 neuronas/mm³ en el grupo KA). La PROG evitó la pérdida neuronal inducida por KA (19.875 ± 2259 neuronas/mm³ en animales inyectados con PROG y KA). Además, el primer producto de la cascada metabólica de la PROG, DHP, también protege las neuronas del hilus de la toxicidad por KA de forma dosis dependiente (17.974 ± 1.827 , 19.213 ± 1.143 neuronas/mm³ en animales inyectados con 0,25 y 0,5 mg/kg de DHP). THP, el último metabolito de la PROG, también es capaz de bloquear la muerte neuronal provocada por la neurotoxina (20.065 ± 1.103 , 19.328 ± 1.365 y 20.322 ± 20.322 neuronas/mm³ en animales inyectados con 2, 4 y 8 mg/kg de THP). En conclusión, la PROG ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas del hipocampo que puede ser en parte debido a la conversión en sus metabolitos, DHP y THP.

P 25

PROPIEDADES DE MEMBRANA DE LAS MOTONEURONAS DEL NÚCLEO OCULOMOTOR DE LA RATA ESTUDIADAS DURANTE EL DESARROLLO EN PREPARACIONES *IN VITRO*

Carrascal L, Nieto-González JL, Torres B, Núñez-Abades P
Dpto. Fisiología y Zoología, Universidad de Sevilla

Las propiedades activas y pasivas de membrana de 43 motoneuronas del núcleo oculomotor se estudiaron durante el desarrollo postnatal (2 a 30 días) en preparaciones *in vitro*. Dichas células se identificaron antidrómicamente como motoneuronas. La duración del potencial de acción varió desde 0,9 a 3 ms, con una pendiente de subida de 22 a 110 V/s y de bajada de 11 a 70 V/s. En dichos potenciales de acción la fase de hiperpolarización se caracterizó por presentar una duración de 150 a 280 ms. La resistencia de entrada varió entre 37 y 300 M Ω y la constante de tiempo entre 5 y 22 ms. La frecuencia máxima de disparo, así como la frecuencia media estuvo comprendida entre valores de 15 a 85 Hz y de 24 a 183 Hz/nA, respectivamente. La mitad de la duración del potencial de acción disminuyó en la primera semana postnatal de 2,21 a 1,45 ms debido al aumento de la pendiente de subida de 32,8 a 61,0 V/s y al aumento de la pendiente de bajada de 19,6 a 34,4 V/s. Al mismo tiempo se observó una tendencia a disminuir la resistencia de la membrana de 139,2 a 80,4 M Ω . Entre la segunda y tercera semana postnatal se encontró un aumento tanto en la frecuencia máxima de disparo, como en la frecuencia media con valores de 30 a 71 Hz y de 55 a 90 Hz/nA, respectivamente. Todos estos resultados muestran que las propiedades de la membrana, tanto activas como pasivas, de estas motoneuronas se modifican durante el desarrollo posnatal. Trabajo financiado con una ayuda de MCYT BFI2000-0335.

P 26

ESTUDIO MORFOFUNCIONAL DE LAS MOTONEURONAS DEL NÚCLEO OCULOMOTOR DE LA RATA ESTUDIADAS DURANTE EL DESARROLLO EN PREPARACIONES *IN VITRO*

Nieto-González JL, Carrascal L, Torres B, Núñez-Abades P
Dpto. Fisiología y Zoología, Universidad de Sevilla

Las propiedades morfofuncionales de las motoneuronas del núcleo oculomotor de ratas se estudiaron durante el desarrollo posnatal. Se

inyectaron intracelularmente con neurobiotina motoneuronas, a las que previamente se identificó mediante estimulación antidrómica y caracterizó sus propiedades electrofisiológicas. Se marcaron 10 células de animales con edades entre 2 y 14 días que fueron reconstruidas con la ayuda de una cámara lúcida. El diámetro mayor del soma varió entre 20 y 35 μ m y el diámetro menor entre 10 y 20 μ m. Las motoneuronas presentaron entre 4 y 7 dendritas principales con un número de terminales por célula entre 9 y 36. La longitud media de las dendritas se situó entre 88 y 276 μ m siendo la longitud de la dendrita más larga entre 155 y 325 μ m. La media del número de nodos de ramificación varió entre 0,8 y 4,14. Entre la primera y segunda semana postnatal se observó una disminución en el número medio de nodos por dendrita de 2,51 a 1,83. En el mismo período de tiempo la longitud máxima dendrítica aumentó de 179,2 a 293,3 μ m y la media de la longitud máxima del conjunto del árbol dendrítico de 130,3 a 232,6 μ m que permitió que algunas dendritas salieran de los límites del núcleo. Este aumento de longitud en la segunda semana postnatal se correlacionó con la disminución en los valores de resistencia de entrada y constante de tiempo observada en dichas motoneuronas y no con el tamaño del soma. Trabajo financiado por una ayuda del MCYT BFI2000-0335.

P 27

INFLUENCIA DE LA HORMONA TIROIDEA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL CEREBRO FETAL

Díez D^a, Morte B^a, Lavado R^a, De Lecea L^b, Escobar del Rey F^a, Morreale de Escobar G^a, Bernal J^a

^aDepartamento de Endocrinología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC/UAM. Madrid, España. ^bDepartments of Molecular Biology, The Scripps Research Institute. La Jolla, California, USA

Existen evidencias del papel de la hormona tiroidea (HT) en el desarrollo del cerebro fetal: la HT materna cruza la placenta a la circulación fetal, los receptores de HT (TR) se expresan en el cerebro del feto antes del comienzo de la función tiroidea, y la ocupación de los TR está en el rango fisiológico. Los niños nacidos de madres hipotiroideas sin tratar durante el segundo trimestre de gestación muestran un considerable déficit neurológico.

Para identificar genes cuya expresión esté afectada en el cerebro fetal por el hipotiroidismo materno o fetal realizamos un análisis de expresión génica mediante microarrays con el chip de Affymetrix RN-U34 (1322 genes).

Los grupos experimentales son: madres controles, hipotiroideas (MMI), hipotiroideas tratadas con T3, hipotiroideas tratadas con T4 y tiroidectomizadas en el día 10 de gestación. Los cerebros fetales (E21) se emplearon para preparar RNA total. Las concentraciones de HT se determinaron en diferentes tejidos y plasma de las madres y fetos con resultados similares a estudios previos. Los datos generados tras tres hibridaciones se analizaron y algunos de los genes seleccionados se confirmaron por *Northern-blot*. Encontramos 32 genes cuya expresión disminuía en el grupo MMI y se recuperaba en el grupo T4. Algunos se habían identificado antes como genes regulados por hormona tiroidea en el cerebro posnatal. Estos resultados indican que tanto la hormona materna como fetal son críticas en el desarrollo del cerebro fetal.

P 28

IDENTIFICACIÓN DE DIANAS CELULARES Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDÓGENO EN LAS ZONAS NEUROGÉNICAS DEL CEREBRO DE RATÓN ADULTO

Romero-Grimaldi MC, Moreno-López B, Noval JA, Estrada C
Area de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Cádiz

En la zona subventricular (SVZ) del cerebro de ratón adulto se generan neuronas que, tras migrar por el camino migratorio rostral (RMS), se diferencian en el bulbo olfatorio (OB). Existen neuronas diferenciadas

que expresan óxido nítrico sintasa (NOS) de tipo I en la proximidad de los precursores en estas tres regiones. La administración sistémica crónica del inhibidor de la NOS, L-NAME, pero no de su estereoisómero D-NAME, produjo un incremento significativo de la densidad de células que incorporaban BrdU en SVZ, RMS y OB, pero no en el giro dentado del hipocampo. Efectos similares se obtuvieron utilizando el inhibidor selectivo de la NOS neuronal, 7-nitroindazol. El aumento del número de mitosis afectó selectivamente a células que expresaban nestina, pero no beta-III tubulina ni GFAP, lo que sugiere que el NO actúa inhibiendo la proliferación de los precursores más primitivos (células C). El número de células apoptóticas y el de células posmitóticas 15 días después de la inyección de BrdU no se modificó con el tratamiento de L-NAME, demostrando que la supervivencia celular no se ve afectada. La migración de los precursores neuronales hacia el bulbo olfatorio tampoco se alteró en los animales tratados. El análisis de marcadores neuronales en el OB indicó que el L-NAME producía un ligero retraso en el proceso de diferenciación. Sugerimos que el NO es un inhibidor fisiológico de la proliferación de precursores primitivos en la SVZ. Financiado por FIS00/1080 y SAF2002-02131.

P 29

EFFECTOS DEL DIETILTIOCARBAMATO (DEDTC) EN EL DESARROLLO DE CEREBRO DE RATÓN. ALTERACIONES EN EL PROCESO DE MIELINIZACIÓN

Junyent F, Valente T, Valente L, Sañe A, Auladell C
Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología,
Universidad de Barcelona. Barcelona

Estudios *in vivo* han permitido identificar el dietiltiocarbamato (DEDTC) como quelante de biometales endógenos, especialmente del cobre y del zinc. La administración de DEDTC puede determinar la inhibición de distintos enzimas, alguno de ellos, como la anhidrasa carbónica, directamente relacionada con la mielinización.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio *in vivo* de algunos de los efectos fisiológicos, celulares y moleculares que puede determinar la administración continuada de DEDTC durante el desarrollo postnatal de ratón. Así, se han observado alteraciones fisiológicas importantes, todas ellas relacionadas con un retraso general en el crecimiento del organismo (de más de un 50%).

Mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas realizadas en secciones coronales de cerebro, en distintos estadios del desarrollo, se han detectado alteraciones en la actividad proliferativa, en el patrón de migración celular y en los procesos gliales.

Cambios en la distribución de GFAP (*glial fibrillar acidic protein*) y una pérdida general de la consistencia del tejido procesado, soportan la posible implicación del DEDTC en los procesos de desmielinización, efecto similar a los que determina la cuprizona (bis-ciclohexano-neoxaldihidrazona), quelante específico del cobre relacionado con un proceso de desmielinización.

Trabajo financiado por el Ministerio de Sanidad FIS (01/0096-02) y AECl01.

P 30

DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD BASAL Y LA SENSIBILIDAD AL CO₂ DE LAS MOTONEURONAS DEL NÚCLEO HIPOGLOSO DE LA RATA ADULTA EN RESPUESTA A LA LESIÓN DE SUS AXONES

Portillo F, González-Forero D, R-Sunico C, Moreno-López B
Área de Fisiología, Universidad de Cádiz

La desconexión de un axón motor con su diana induce alteraciones en las propiedades de disparo de la motoneurona (MN) debido, en parte, a la disminución del número y la eficacia de sus aferentes sinápticas. Las MNs del núcleo hipogloso (XII) disparan brotes de potenciales durante la fase

inspiratoria a una frecuencia de disparo dependiente de la PCO₂. En ratas Wistar macho, con 5% de CO₂ en aire espirado (CO₂esp), la lesión por aplastamiento del nervio XII indujo una disminución progresiva de la actividad neurográfica proximal (40%, 50% y 60%; 3, 7 y 15 días tras la lesión) que se recuperó a los 22 días. En animales operados *sham* no se modificó el neurograma. Para discernir entre una disminución en la actividad de las neuronas y posibles fallos en la conducción del impulso se registró la actividad unitaria de las MNs. La tasa de disparo basal, medida como frecuencia media por brote (potenciales de acción por segundo) de las MNs (5% CO₂esp) pasó de 42,0±18,4 (media±SD; n=96) en el control a 17,0±13,0 (n=62) 15 días tras el daño (60% de reducción). Paralelamente, la sensibilidad de las MNs al CO₂esp (3-7%), medida como la pendiente de la recta de regresión que relaciona frecuencia media de brote y CO₂esp, se redujo de 7,5 ± 5,4 (n=41) en control a 4,3±3,6 (n=52) 15 días tras la lesión. Se sugiere que la lesión del nervio induce una reducción en la actividad de las MNs debida, en parte, a una disminución de la eficacia o número de sus entradas sinápticas.

Financiación: MCYT (BFI2001-3816).

P 31

EL ÓXIDO NÍTRICO INHIBE PROCESOS REGENERATIVOS TRAS LA LESIÓN DE UN NERVI PERIFÉRICO EN LA RATA ADULTA

R-Sunico C, González-Forero D, Portillo F, Moreno-López B
Área de Fisiología, Universidad de Cádiz

El óxido nítrico (NO) inhibe el crecimiento de neuritas in cultivo. En respuesta al daño en un nervio periférico la expresión de óxido nítrico sintasa (NOS) aumenta en la zona de lesión. El NO podría estar afectando a los procesos de reinervación de la diana. En ratas Wistar macho (200-300 g), se lesionó unilateralmente por aplastamiento el nervio hipogloso. Tras 7 días, en los animales inyectados con vehículo no se generó potencial de acción muscular compuesto (PAMC) inducido por estimulación eléctrica del nervio, mientras que en los animales tratados con un inhibidor de la NOS (L-NAME; 90 mg/kg/día; IP) el PAMC alcanzó el 20% del registrado en el nervio contralateral. Con el objeto de estudiar un posible papel del NO sobre el crecimiento de los axones se seccionó el nervio 1 cm distal a la lesión introduciéndolo en una solución de fluorogold. El número de motoneuronas marcadas retrógradamente se utilizó como un índice del grado de crecimiento de los axones desde el sitio de lesión hasta el punto de bombeo del fluorocromo. Dos días después de la lesión se observó un aumento significativo en el número de motoneuronas marcadas en los animales tratados con L-NAME (1241,0±77,7; media±ES; n=4) con respecto a los tratados con el vehículo (455,4±198,6; n=3). Esto sugiere que el NO producido en el sitio de lesión está afectando al proceso de reinervación del músculo, al menos, por la inhibición del crecimiento axonal.

Financiado por MCYT (BFI2001-3816).

P 32

EXPRESSION PATTERNS AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF THE DOWN SYNDROME CANDIDATE PROTEIN MNB/DYRK1A SUGGEST A ROLE IN LATE NEURONAL DIFFERENTIATION

Elizalde C, Hämmerle B, Carnicero A, Cerón J, Martínez S, Tejedor FJ
Unidad de Neurobiología del Desarrollo, Instituto de Neurociencias,
CSIC y Universidad Miguel Hernández

The MNB/DYRK1A gene belongs to a new protein kinase family, which is evolutionarily conserved, and seems to play several roles during brain development and in mature brain. In *Drosophila*, *mn*b is involved in postembryonic neurogenesis and in learning/memory. In humans, MNB/DYRK1A has been mapped within the Down syndrome critical region of chromosome 21 and has been widely proposed to be involved in the

neurobiological alterations associated with Down syndrome. Nevertheless, little is known about the functional role that MNB/DYRK1A plays in vertebrate brain development. We have recently shown (Hämmerle et al. Dev Biol 2002; 246: 259-73) that in early vertebrate embryos, Mnb is transiently expressed in neural progenitor cells during the transition from proliferating to neurogenic divisions. Here we study a second wave of MNB/DYRK1A expression, which takes place in the brain of intermediate and late vertebrate embryos. In these stages, MNB/DYRK1A seems to be restricted to certain populations of neurons, since no consistent expression was detected in astroglial or oligodendroglial cells. According to the temporal pattern of expression and the subcellular localization, we conclude that MNB/DYRK1A kinase is involved in the signaling mechanisms that regulate dendritic tree differentiation. This new role of MNB/DYRK1A on brain development helps to build a novel hypothesis for its implication in the developmental etiology of Down syndrome neuropathologies.

P 33

PROLIFERACIÓN NEURAL EN EL CRECIMIENTO Y EN LA REGENERACIÓN DE LA RETINA DE TELEÓSTEOS

Cid E, Velasco A, Marchena M, Lara JM, Aijón J

Departamento de Biología Celular y Patología, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca

La retina de vertebrados anamniotas es actualmente uno de los principales modelos para estudiar los procesos de proliferación y diferenciación celular del sistema nervioso central. En estos animales se mantiene una zona de neurogénesis en el margen ciliar de la retina que refleja espacialmente los procesos que ocurren durante la retinogénesis. En teleósteos, modelo empleado en este trabajo, la retina presenta una característica adicional: posee una segunda línea neurogénica, cuyos progenitores se distribuyen por la retina madura en columnas radiales. En condiciones normales estos precursores neurales forman sólo bastones, pero tras una lesión de la retina originan todos los tipos celulares retinianos.

Mediante inmunocitoquímica para el antígeno nuclear de células proliferativas, analizamos la distribución de los progenitores retinianos en condiciones normales en las retinas adultas de dos especies, tenca y carpin. También hemos aplicado una técnica de cuantificación de ADN por citometría de flujo, para determinar la tasa total de proliferación en la retina. Y demostramos, mediante PCR, que varios genes implicados en el desarrollo embrionario (NeuroD, Rx3, Ath3 y Her6) continúan expresándose en la retina adulta de estos animales. Además, tras criolesiones en la zona periférica de la retina analizamos las modificaciones de la proliferación celular durante la regeneración de la retina.

Financiación: Junta de Castilla y León (SA067/03) y FISS (PI021730).

P 34

ORIGEN Y DESARROLLO EMBRIONARIO DE LOS SISTEMAS SEROTONINÉRGICOS DE LA PINTARROJA (*SCYLIORHINUS CANICULA*), CON ESPECIAL REFERENCIA A LOS RAJE RETICULARES

Carrera I^a, Sueiro C^a, Molist P^b, Rodríguez-Moldes I^a, Anadón R^a

^aDepartamento de Biología Celular y Ecología, Universidad de Santiago.

^bDepartamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo

Hemos estudiado el desarrollo del sistema serotoninérgico en un elasmobranquio, la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*), utilizando métodos inmunohistoquímicos. Las primeras neuronas inmunorreactivas a serotonina aparecen en la región del istmo de embriones de estado 26, formando un pequeño grupo par a ambos lados de la placa solar. En los estados 28-30, el número de dichas neuronas se ha incrementado, y comienzan a verse neuronas con morfología migratoria que cruzan la placa solar o se extienden lateralmente por la fina capa marginal. En el estado 31, su número se ha incrementado notablemente en el istmo, extendiéndose algunas células muy lateralmente desde la región mediana,

y además células serotoninérgicas aparecen en regiones caudales del bulbo a ambos lados de la placa solar. En el estado 33, las poblaciones migradas hacia áreas reticulares se han incrementado notablemente a lo largo de todo el tronco cerebral. Desde el estado 29 es posible ver conspicuos conos de crecimiento que crecen desde el istmo bien en dirección rostral o bien caudal cerca de la línea media, formando tractos longitudinales que en el estado 31 alcanzan rostralmente la comisura posterior, tubérculo posterior y telencéfalo basal caudal, y caudalmente se extienden en el funículo ventromedial de la médula espinal. En el estado 31 aparecen nuevas poblaciones serotoninérgicas en el diencéfalo, y en el estado 33 son ya notables las poblaciones LCR-contactantes del órgano paraventricular (núcleos de los recesos laterales y posteriores). En regiones dorsales del encéfalo y médula espinal de la pintarroja, la innervación serotoninérgica aparece tardíamente. Financiado por Ministerio de CyT (BXX2000-0453-C02) y Xunta de Galicia (PGIDT99BIO20002 y PGIDT01PXI20007PR).

P 35

PAPEL DE LA FOSFOLIPASA A2 DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA

Avilés-Trigueros M^a, De S^b, Kalyvas A^b, David S^b

^aInstituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández.

Alicante, España. ^bCentre for Research in Neurosciences, McGill University, Montreal General Hospital Research Institute. Montreal, Quebec, Canadá

El enzima fosfolipasa A2 (PLA2) hidroliza fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina y ácido araquidónico. El primero puede inducir la ruptura de la mielina y el último mediante la vía de los ácidos eicosanoicos puede estimular la respuesta inflamatoria.

El estudio inmunohistoquímico de las formas secretada (sPLA2) y citosólica (cPLA2) de PLA2 se realizó en nervios ciático y óptico de rata y ratón adultos lesionados por aplastamiento.

Las formas sPLA2 y cPLA2 se expresan durante las primeras dos semanas en nervio ciático lesionado; lo que se correlaciona con la rápida degeneración walleriana (DW) del sistema nervioso periférico. En contraste, ambas formas de PLA2 no se expresaron en nervio óptico durante las primeras tres semanas después de su lesión, lo que concuerda con la lenta DW del sistema nervioso central. Además, PLA2 no se expresa en el nervio ciático de ratones mutantes C57BL/Wlds, en los que la DW está seriamente retardada. El bloqueo de cPLA2 en el nervio ciático de ratones C57BL/6, que tienen una mutación *null* producida naturalmente para la forma principal de sPLA2, resulta en una degradación y fagocitosis marcadamente más lenta de la mielina y restos axonales del segmento distal del nervio tras su lesión.

Estos resultados proporcionan evidencias directas del importante papel de cPLA2 en la DW: 1) Su expresión se correlaciona con el ritmo de DW; 2) Media en la ruptura mielina/axón y entrada de macrófagos durante la DW; 3) Estimula la fagocitosis durante la DW.

P 36

EFFECTO DE LA ADRENALECTOMÍA BILATERAL MATERNA EN EL DESARROLLO POSNATAL DE LOS SISTEMAS CATECOLAMINÉRGICOS

Rúa C^a, Tecedor L^a, González JC^b, Machín C^a

^aDepartamento de Biología Celular (Morfológica Microscópica), Universidad Complutense de Madrid. ^bDepartamento de Biología Animal II (Fisiología), Universidad Complutense de Madrid

Estudiamos la influencia de los glucocorticoides (GC) maternos en los sistemas catecolaminérgicos (CA) cuyo desarrollo es anterior a la secreción GC fetal.

En un grupo de ratas adrenalectomizadas bilateralmente el día 1.º de gestación (grupo ADX) y en otro con operación simulada observamos

en las crías P1, P8, P12 y P22 el desarrollo de sistemas CA por inmunohistoquímica para la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Posnatalmente se observa aumento gradual en la densidad de marcaje para TH menos en la innervación CA al estriado ventral que disminuye. La innervación septal y cortical incrementa en la 2.^a y 3.^a semanas posnatales, coincidiendo con el pico de sinaptogénesis y crecimiento dendrítico en áreas corticales. En crías de ADX, la mayoría de las neuronas inmunomarcadas muestran reducción del desarrollo dendrítico hasta P12. Las aferencias CA al estriado dorsal disminuyen en ADX, pero se incrementan en la ruta mesolímbica ventrolateral hasta P12. En estriado y n. accumbens, cuyos picos de neurogénesis coinciden con una ausencia total de GC en ADX, se vio un retraso de las conexiones nigroestriales dorsomediales en este grupo. En áreas cuyos picos de neurogénesis no coinciden con ausencia de GC, no se vieron cambios. Asimismo, la innervación CA a hipocampo y neocorteza es menor en crías de ADX. La expresión CA temprana y sus modificaciones por efecto de la adrenalectomía materna sugieren un papel regulador de estos neurotransmisores en el desarrollo encefálico. Financiación: PR 269/98-8195.

P 37

IMPPLICACIÓN DE LA DOPAMINA EN LA MADURACIÓN NEURONAL DEL NÚCLEO ESTRIADO

Pezzi S, Alberch J

Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica. Universidad de Barcelona

En el presente trabajo se ha estudiado la implicación de las vías dopaminérgicas nigroestriales y las glutamatérgicas corticoestriales en el desarrollo y maduración de las neuronas del núcleo estriado. Para ello se ha realizado una lesión al segundo día posnatal (P2) con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una lesión a P7 con ácido quinolínico (QUIN), o bien ambas en un modelo de doble lesión (6-OHDA a P2 y QUIN a P7) realizándose el análisis a P30. Una única inyección de 6-OHDA o de QUIN provoca una reducción en el volumen total del núcleo estriado, siendo ésta máxima cuando se realiza la doble lesión. La lesión excitotóxica inducida por QUIN a P7 sobre las neuronas calbindina-positivas es revertida por la falta de innervación dopaminérgica. Las neuronas parvalbúmina-positivas son sensibles a la ablación dopaminérgica y a la excitotoxicidad inducida por QUIN, pero el patrón de la lesión no está alterado con la doble lesión. Por el contrario, el número de las neuronas colinérgicas no varía indicando una resistencia a los distintos tipos de lesión. También se ha analizado por inmunohistoquímica sustancia P y encefalinas, mostrando cambios en el volumen y en el marcaje de las fibras según el tipo de lesión. Estos resultados indican que la innervación dopaminérgica regula la maduración de las distintas poblaciones de neuronas estriales y su respuesta a estímulos excitotóxicos. Financiación: CICYT (SAF-2002-0314), Fundació La Caixa y Fundació Ramón Areces.

P 38

EFFECTO DE LA ADRENALECTOMÍA MATERNA EN LA EXPRESIÓN POSNATAL DE LOS RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO EN EL CEREBELO DE RATA

Tecedor L^a, Machín C^a, Peinado V^b, Rúa C^a

^aDepartamento de Biología Celular (Morfología Microscópica), Universidad Complutense de Madrid. ^bDepartamento de Biología Animal II (Fisiología), Universidad Complutense de Madrid

La rata expresa receptores de glucocorticoides (GC) a partir del día 13 de gestación (E13) aunque los GC fetales se secretan desde E17. En este intervalo los GC en el feto son maternos. Para conocer los efectos de estos GC maternos, el día 1 de gestación se adrenalectomizó

bilateralmente un grupo de madres (ADX) y en otro se simuló la operación (control). En los días posnatales P1, P8, P12 y P22 se estudiaron inmunohistoquímicamente las subunidades NR1 del receptor NMDA y GluR1, GluR2/3 y GluR4 del receptor AMPA.

La expresión de estas subunidades varía en el desarrollo postnatal. Las crías de ADX presentan retraso madurativo respecto al control, diferencias que van disminuyendo y no se aprecian en P22. En P1 la expresión de NR1 revela un retraso del patrón de migración en crías de ADX al aparecer mayor número de células migrando y menos situadas en destino. En P8 las células de Purkinje muestran en las crías de ADX un menor desarrollo dendrítico. La expresión de GluR1 y GluR4 indica un retraso madurativo en P1 de la glía de Bergman y de la migración celular y en P8 de las capas molecular y granular en el grupo ADX. El marcaje para GluR2/3 en la capa de Purkinje de P1 es en células basket y de Lugaro y en P8 es en células de Purkinje. En el grupo ADX esta transición de marcaje a las células de Purkinje está retardada. El retraso observado en la expresión de los receptores estudiados indica un papel regulador de los GC maternos en el desarrollo del cerebelo. Financiación: PR 269/98-8195.

P 39

PAPEL DE LOS RECEPTORES DE HORMONA TIROIDEA EN EL DESARROLLO DE LOS ASTROCITOS

Manzano J^a, Morte B^a, Scanlan T^b, Vennström B^c, Bernal J^a

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM.

Madrid, España. ^bDepartments of Pharmaceutical Chemistry and Molecular Pharmacology, Univ. California. San Francisco, CA, USA. ^cDepartment of Cell and Molecular Biology, Karolinska Institute. Stockholm, Sweden

La hormona tiroidea controla numerosos aspectos en el desarrollo del cerebelo a través de su interacción con receptores nucleares dependientes de ligando (TR α y TR β). Al contrario que en animales hipotiroideos, los animales deficientes de TR son viables y no presentan signos graves de alteraciones neurológicas.

Hemos analizado el desarrollo de los astrocitos en animales deficientes de TR α (TR α -/-). En animales controles la maduración de los astrocitos implica un cambio secuencial en la expresión de filamentos intermedios nestina, vimentina y GFAP. En los animales TR α -/- hay una clara alteración en la maduración de los astrocitos. A P11 la glía de Bergman presenta un patrón inmunohistoquímico a parches, y tanto el número de GFAP+ como su distribución están alterados, presentando una acumulación en la sustancia blanca. El hipotiroidismo inducido en animales controles produce un retraso en la maduración y migración de los astrocitos, sin embargo al inducir hipotiroidismo en animales TR α -/- los astrocitos se desarrollan normalmente. Si tratamos a estos animales con un compuesto agonista de TR β , GC-1, se observa un fenotipo similar al observado en los animales eutiroides TR α -/-. El tratamiento a animales eutiroides TR α -/- con un compuesto antagonista de TR β , NH3, previene las alteraciones observadas en el desarrollo de los astrocitos. Todos estos resultados indican que en ausencia de TR α 1, la activación de TR β ejerce una acción inhibitoria en la maduración de los astrocitos.

P 40

PATRÓN DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE ASTROCITOS EN EL DESARROLLO DEL CEREBELO

Morte B, Manzano J, Bernal J

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM. Madrid

La hormona tiroidea (T3) controla aspectos críticos del desarrollo del cerebelo, como la migración de las células granulares y la diferenciación de las células de Purkinje. En este trabajo hemos analizado el patrón de maduración de los astrocitos del cerebelo mediante inmunohistoquímica con marcadores para los filamentos intermedios nestina, vimentina y

GFAP desde día postnatal cero, P0 hasta P32, y la influencia de la T3 en este proceso.

Desde P0 a P4 se observa un extenso marcaje de nestina y vimentina a través de los astrocitos distribuidos en todos los lóbulos y en la glía de Bergman. Los astrocitos GFAP+ se localizan a P0 únicamente en la zona del velo medular superior y pueblan poco a poco el cerebelo a través de la sustancia blanca y alcanzando la capa granular interna a P4. Sorprendentemente, a P6 el marcaje para los tres marcadores desaparece en los lóbulos anteriores mientras permanece en los lóbulos posteriores y centrales. Este efecto no se detectó en los animales hipotiroideos. A P8 astrocitos GFAP+ aparecen de nuevo en la sustancia blanca del lóbulo anterior. Mediante técnicas de Túnel hemos analizado si la desaparición de los astrocitos de los lóbulos anteriores a P6 es debida a muerte celular.

Desde P10 a P32 la maduración normal de los astrocitos se asocia con una pérdida de expresión de vimentina y aumento de GFAP en astrocitos que se distribuyen a través de todo el lóbulo cerebelar y abandonan la sustancia blanca. Los animales hipotiroideos muestran un importante retraso en estos procesos del desarrollo.

P 41

DESARROLLO PRE Y POSNATAL DE LA PROYECCIÓN A CAPA I EN CORTEZA FRONTAL Y CINGULAR DE RATA

Galazo MJ, Martínez-Cerdeño V, Clascá F

Departamento de Morfología, Universidad Autónoma de Madrid

Aunque la proyección talamocortical a la capa I (TCI) es un sistema masivo en el adulto, su desarrollo apenas ha sido estudiado. Hemos examinado en la rata el proceso de invasión y arborización de axones talamocorticales desde núcleos que en el adulto proyectan abundantemente a la capa I como el ventromedial, *reuniens* y anteromedial. Empleamos trazado axonal anterógrado tras microinyecciones de biocitina en cerebros embrionarios (E16-21) *ex vivo*, o de dextrano biotinilado en animales posnatales (P0-P7).

Respecto a la secuencia de desarrollo de axones talamocorticales, nuestros resultados coinciden en general con los datos publicados en estudios con carbocianinas. No obstante, en E18-19 observamos los conos de numerosos axones marcados que alcanzan la zona marginal (MZ, futura capa I), sin extenderse tangencialmente en ella. Esta invasión podría ser transitoria, ya que en E20-21 ni MZ ni la placa cortical contienen axones marcados que, en cambio, se acumulan en gran número en la subplaca. Mas adelante (E21-P0), los axones invaden progresivamente desde la subplaca, las capas VI y V a medida que éstas se diferencian. En P0 observamos ocasionalmente algunos axones que han atravesado la placa cortical y se extienden tangencialmente en MZ/capa I; sin embargo, la invasión y arborización generalizada en esta capa se produce en la primera semana postnatal. Estos datos indican que, en roedores, la invasión y arborización del sistema TCI es coetánea o sólo ligeramente anterior (1-2 días) a la invasión talamocortical de la capa IV, a diferencia de lo observado en carnívoros y marsupiales.

P 42

NEURREGULINA-1 ES UN FACTOR QUIMIOATRACTIVO QUE MEDIA LA MIGRACIÓN TANGENCIAL DE LAS INTERNEURONAS CORTICALES

Flames N^a, Long JE^b, Lai C^c, Rubenstein JLR^b, Marín O^a

^a Unidad de Neurobiología del Desarrollo, Instituto de Neurociencias de Alicante, UMH-CSIC. ^b Department of Psychiatry, UCSF. San Francisco, USA. ^c The Scripps Research Institute. San Diego, USA.

La mayor parte de las interneuronas de la corteza cerebral se originan en el telencéfalo basal, en una región denominada eminencia ganglionar medial (MGE). Las interneuronas alcanzan la corteza a través de una migración tangencial que sigue un patrón espacio-temporal altamente definido,

controlada tanto por factores repulsivos como atractivos. Así, el área preóptica constituye un dominio repulsivo para las interneuronas corticales, mientras que la corteza contiene una actividad atractiva. Las moléculas responsables de estas actividades no han sido todavía identificadas.

Recientemente, se ha descrito que las interneuronas corticales expresan ErbB4, un receptor de alta afinidad para neurregulina 1 (NRG1). Además, Nrg1 se expresa en la corteza durante la migración tangencial de las interneuronas, lo que sugiere que esta molécula podría ser responsable de la actividad atractiva presente en la corteza. En la actualidad estamos investigando el papel de NRG1 en este proceso mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*. Nuestros experimentos demuestran que una isoforma difusible de NRG1 atrae a células de MGE en migración. Además, nuestro análisis preliminar de ratones deficientes para el receptor ErbB4 sugiere que existe una disminución en el número de interneuronas corticales. Estos resultados indican que NRG1 es responsable, al menos en parte, de la actividad atractiva presente en la corteza embrionaria que contribuye a dirigir la migración tangencial de las interneuronas corticales.

P 43

FUNCIÓN DEL IGF-I EN EL DESARROLLO DEL OÍDO INTERNO DE RATÓN

Vigil P^a, Morales JA^a, Díaz-Casares A^a, Rico Y^a, Castilla I^a, Contreras J^b, Cediell R^b, Varela-Nieto I^a

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM. Madrid.

^b Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

El oído interno es una estructura muy diferenciada responsable de la audición y del equilibrio. Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF) participan en su morfogénesis y maduración funcional. La mutación en humanos del gen *Igf-1* causa sordera neurosensorial (Varela-Nieto et al. Mol Neurobiol 2003).

El déficit de IGF-I causa un retraso en la diferenciación neuronal, menor mielinización y sinapsis anormales en la cóclea postnatal del ratón. Los ratones nulos IGF-I a edad P5 no presentan alteraciones en la cóclea, lo que sugiere la existencia de mecanismos de compensación en las etapas anteriores.

Mediante inmunohistoquímica, se analizó la presencia de los factores y receptores de la familia de la insulina en cócleas de ratones *igf-1*+/- y +/-+. A P5 se observa un aumento de IGF-II en el órgano de Corti y en el ganglio coclear, y del receptor de insulina en éste último. En paralelo se estudió el fenotipo vestibular asociado. La cuantificación de la expresión de estos genes se realizó mediante RT-PCR a tiempo real. Finalmente, se utilizó el test de ABR (*auditory brain response*) para conocer si los ratones deficientes en IGF-I presentan alteraciones auditivas, a P30 se aprecia un incremento en los umbrales de audición y en la latencia respecto a los controles lo que sugiere que presentan una menor velocidad de conducción del estímulo sonoro.

P 44

IMPLANTE INTRATECAL DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA

Serrano AB, Paíno CL

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

El estroma de la médula ósea contiene células mesenquimales que son fácilmente aislables y expandibles en cultivo. Hemos estudiado la posibilidad de utilizar estas células para implantes autólogos que liberen sustancias neuroactivas en el SNC. Se sembró estroma de médula ósea del fémur de ratas en medio α -MEM/20% FBS y las células mesenquimales se seleccionaron por su adhesividad al frasco de cultivo. Tras 7-10 días de expansión las células se marcaron con bisbenzimidaz (tinción de DNA). Al día siguiente, se tripsinizaron y se marcaron adicionalmente con PKH26 (diI, citoplásmico), y se mantuvieron en medio L-15 a 4°C durante

0-2 horas hasta su implante. Simultáneamente se prepararon ratas adultas para el implante intratecal de células mediante punción lumbar directa (De la Calle y Paino. *Brain Res Bull* 2002; 59: 245). Así, tras el flujo espontáneo de 50 µL de LCR, se inyectaron, por la misma aguja, 20 µL de suspensión celular (100.000 células/µL). A los 7 o 70 días, se perfundieron las ratas con fijador y se extrajeron las médulas espinales, las meninges y las raíces nerviosas. Se observaron células doblemente marcadas en niveles torácicos y lumbares del canal vertebral, adheridas a las meninges y a la superficie de las raíces y aparentemente integradas en estos tejidos. Secciones de la médula espinal al vibratomo mostraron asimismo células teñidas en la superficie pial e, incluso, adentradas por los septos espinales. Estos resultados sugieren que las células mesenquimales de médula ósea se integran establemente en las meninges, por lo que podrían utilizarse como bombas biológicas para la secreción de sustancias neuroactivas al LCR.

P 45

PAPEL DEL SITIO SHC DE TrkB EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS NEURONAS MOTORAS INDUCIDA POR BDNF Y NT4

Terrado J^{a,b}, Postigo A^c, Ferri A^b, Klein R^c, Kato AC^b

^aDepartamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, Valencia. ^bDepartment APSIC and Division of Clinical Neuromuscular Research, Faculty of Medicine, University of Geneva, Switzerland. ^cEuropean Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

En este trabajo hemos estudiado los mecanismos moleculares que median las actividades biológicas de TrkB en las motoneuronas, utilizando ratones transgénicos a los que se generó una mutación en la tirosina yuxtamembrana del gen de TrkB (trkBShc/shc). Esta tirosina se une a las proteínas adaptadoras Shc y FRS2, y se cree que es decisiva en las propiedades de las neurotrofinas en cuanto a supervivencia y diferenciación. Aquí presentamos el estudio del papel de esta mutación en la supervivencia de las motoneuronas. En primer lugar comprobamos el número de neuronas motoras de los ratones trkBShc/shc frente a los ratones control (no mutantes) y no detectamos diferencias significativas. A continuación realizamos la transección del nervio facial en ratones recién nacidos y estudiamos la capacidad de BDNF y NT4 para rescatar las motoneuronas lesionadas en trkBShc/shc. Nuestros resultados muestran que la capacidad de BDNF para inducir la supervivencia de las neuronas motoras en ratones trkBShc/shc es la mitad que en los ratones control. NT4 tiene intrínsecamente menor capacidad para rescatar neuronas. Sin embargo, la supervivencia producida por NT4 no se vio afectada por la mutación ya que el número de neuronas que sobrevivieron a la lesión tras el tratamiento con esta neurotrofina fue similar en ratones control y en mutantes. Estos resultados sugieren que los mecanismos por los que BDNF y NT4 median la supervivencia de las neuronas depende del ambiente celular en que se desarrollen.

P 46

DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE NEURALES DE LA EMINENCIA GANGLIONAR Y DEL BULBO OLFATORIO: COMPARACIÓN DE SU POTENCIALIDAD

Vergaño-Vera E^a, Yusta-Boyo MJ^a, De Pablo F^a, De Castro F^b, Vicario-Abejón C^a

^aGrupo de Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. ^bInstituto de Neurociencias de Castilla y León-INCYL, Universidad de Salamanca

Durante el desarrollo embrionario, muchos de los precursores neuroepiteliales del sistema nervioso (SN) de vertebrados poseen el potencial de diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, al igual que la capacidad de autorrenovación, lo que indica que se trata de células madre neurales (CMN). Las CMN se han aislado del cerebro de animales adultos, incluidos primates y humanos. Con el objeto de investigar

si las CMN poseen especificidad regional en su capacidad para generar los diferentes fenotipos celulares ya mencionados, hemos aislado CMN de dos regiones distintas del SN del embrión de ratón (E13,5 y E14,5): la eminencia ganglionar (EG) y el bulbo olfatorio (BO). Las células crecieron en forma de neuroesferas en flotación, en presencia de FGF-2 y EGF, y se estudió su capacidad proliferativa. Mientras que durante los primeros días de cultivo las CMN del BO sólo proliferan en respuesta a FGF-2, las de EG responden tanto a FGF-2 como EGF. Para iniciar la diferenciación de las células se retiró el FGF-2 y el EGF, tras los correspondientes pases, y se mantuvieron durante 3-10 días en un medio libre de suero. Los porcentajes de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos obtenidos a partir de las células de EG y BO fueron significativamente diferentes. Nuestros resultados sugieren, por tanto, que las células madre derivadas de EG y BO presentan diferencias intrínsecas tanto en su capacidad para responder a mitógenos como en la de generar neuronas y glía.

P 47

MORFOGÉNESIS DEL SISTEMA VISUAL DEL PEZ CEBRA: ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Arenzana FJ, Clemente D, Arévalo R, Aijón J, Porteros A
Departamento de Biología Celular, Universidad de Salamanca

Durante la morfogénesis de la vía visual, los axones de las células ganglionares abandonan la retina neural y se dirigen mayoritariamente al techo óptico (TO), aunque también a otras regiones diana diencefálicas. Para establecer el patrón morfogenético de las regiones del sistema nervioso central (SNC) que forman la vía visual del pez cebra hemos estudiado la expresión del antígeno neural zn-1 y de GFAP. Zn-1 es un antígeno de expresión temprana en el SNC del pez cebra, mientras que GFAP permite establecer los límites entre las regiones que integran el tubo neural (Marcus y Easter, 1995).

El antígeno zn-1 se expresa por primera vez a las 36 horas postfecundación (hpf) en la retina, estadio en el que aparecen las primeras neuronas postmitóticas, en el *pretectum* y en el TO. A las 48 hpf aumenta la densidad de células marcadas en la retina y en el TO. En este mismo estadio aparece marcaje para GFAP en procesos de la retina y del TO. Tras la eclosión, disminuye la expresión de zn-1 tanto en la vía visual como en el resto del SNC. Sin embargo, la expresión de GFAP se mantiene, encontrándose además marcaje en el nervio óptico entre las 60 hpf y las 96 hpf.

El análisis combinado de la expresión de zn-1 y GFAP permite caracterizar morfológica y neuroquímicamente las poblaciones neurales de la vía visual en desarrollo. Además, la expresión transitoria de GFAP en el nervio óptico podría estar relacionada con la ordenación de las proyecciones retinianas pioneras.

P 48

EFFECTO DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO EN LA ACCIÓN DE IGF-I SOBRE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA

Pérez-Martín M^a, Azcoitia I^b, Trejo JL^a, Sierra A^a, García-Segura LM^a

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

El hipocampo es una de las regiones del SNC de mamíferos donde la producción de neuronas continúa en etapas posnatales. Las nuevas neuronas procedentes de precursores localizados en la zona subgranular del giro dentado, se diferencian en neuronas granulares funcionalmente activas. Entre los factores que favorecen la neurogénesis destacan el IGF-I y el estradiol (E2). En este estudio hemos valorado la posible interacción de estos dos factores en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta. Ratas hembras fueron ovariectomizadas y tratadas con IGF-I, E2 o el antagonista del receptor de estrógeno (ICI 182,780) durante una semana, recibiendo diariamente una inyección de BrdU. El número total de nuevas

neuronas fue significativamente mayor en los animales tratados simultáneamente con IGF-I y E2 comparados con los controles o los animales tratados sólo con IGF-I o E2. El antiestrógeno ICI 182,780 bloqueó el efecto de IGF-I sobre el número total de nuevas neuronas. Estos resultados indican que los receptores de estrógeno están involucrados en la inducción de neurogénesis por parte de IGF-I en el giro dentado de la rata. Financiado por la CE (QLK6-CT-2000-00179).

P 49

CÉLULAS MADRE Y PROGENITORAS EN BULBO OLFATIVO: SEÑALES DE SUPERVIVENCIA Y DIFERENCIACIÓN DURANTE EL DESARROLLO

Yusta-Boyo MJ^a, González M^b, Bernad A^b, De Pablo F^a, Vicario-Abejón C^a

^aGrupo de Factores de Crecimiento en el Desarrollo de Vertebrados, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid. ^bDepartamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Madrid

Durante el desarrollo embrionario de vertebrados, muchos precursores neuroepiteliales tienen capacidad de autorrenovación y multipotencialidad, lo que las define como células madre (CM) neurales. Sin embargo, se desconocía la existencia de estas células en bulbo olfativo (BO), así como la regulación de su proliferación y diferenciación. Hemos aislado y caracterizado CM procedentes de BO de ratón (E12,5-E14,5). Estas células se mantuvieron en cultivo en presencia de EGF y FGF-2, durante al menos 5,5 meses conservando la expresión del marcador nestina. Mediante análisis clonal, se comprobó su autorrenovación y multipotencialidad, obteniéndose neuronas, astrocitos y oligodendrocitos a partir de clones procedentes de una célula. Las CMBO se diferenciaron mayoritariamente a neuronas (52%), que expresaron marcadores como calretinina, GABA y tirosina hidroxilasa. En sus axones se detectó la presencia de proteínas sinápticas como sinapsina-I y SV2. El IGF-I y la (pro)insulina potenciaron los efectos del FGF-2 y el EGF durante la proliferación de las CMBO. El IGF-I promovió, su diferenciación a neuronas y glia. La proporción de células diferenciadas fue considerablemente menor en cultivos procedentes de ratones Igf-I/- respecto a los silvestres. *In vivo*, la ausencia de IGF-I causó una alteración en la formación de la capa de neuronas mitrales. Actualmente, estamos estudiando los mecanismos de acción del IGF-I y de otros factores durante la proliferación y diferenciación de las CMBO.

P 50

ANÁLISIS NEUROQUÍMICO DE LAS POBLACIONES DE INTERNEURONAS DEL BULBO OLFATORIO DEL RATÓN SEYDEY

Murias AR, Weruaga E, Valero J, Gómez C, Alonso JR
Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Departamento de Biología Celular y Patología, Universidad de Salamanca

Los ratones SeyDey poseen una mutación denominada *Dickie's small eye*, que consiste en una delección de varios genes, entre ellos el Pax-6. La mutación afecta al desarrollo y regionalización del cerebro anterior, incluido el sistema olfatorio y el sistema visual. Los heterocigotos son más pequeños que los homocigotos sin la mutación, pero alcanzan edades adultas, mientras que los homocigotos para la mutación mueren antes del sexto día de gestación.

Describimos los cambios neuroquímicos que se producen en el bulbo olfatorio principal de los ratones SeyDey. Con la técnica de Nissl observamos diversos grados de alteración en su morfología en los ratones heterocigotos. El marcaje de Pax-6 disminuye drásticamente en la capa glomerular y desaparecen las células periglomerulares positivas para tirosina hidroxilasa. En la capa plexiforme externa la inmunorreactividad para la calretinina, calbindina y parvalbúmina disminuye. En la capa plexiforme interna, hay una gran disminución de células marcadas con

neurocalcina. Aumenta ligeramente la cantidad de células empenachadas externas positivas para la óxido nítrico sintasa I, al igual que la actividad NADPH-diaforasa, pero ésta desaparece de gran parte las células periglomerulares que la exhiben en el ratón normal. Estos cambios apuntan a una regulación transináptica de algunos de los marcadores neuroquímicos estudiados.

Subvencionado por DGES (PM99-0068), Junta de Castilla y León, Fundación Samuel Solórzano y Plan Nacional sobre las Drogas.

P 297

EXPRESIÓN DE LA NOS EN LA MÉDULA ESPINAL DE POLLO DURANTE EL DESARROLLO

Ribera J, Castaño R, Ciutat D, Calderó J, Casanovas A, Tarabal O, Casas C, Esquerda J

Departament de Neurobiologia Cel·lular, Universitat de Lleida

Diversos trabajos indican que el NO podría intervenir en procesos relacionados con la diferenciación, maduración neuronal y que en algunos casos existe un paralelismo entre la producción de NO y el crecimiento neurítico relacionado con el establecimiento del patrón de arborización dendrítica. Hemos estudiado la expresión de NOS en la médula espinal de pollo entre E-5 y E-12. La expresión de nNOS en la médula espinal empieza a detectarse en E-5, período en que se observan algunas neuronas inmuoreactivas en la región mediolateral. A partir de E-5 aparecen nuevas poblaciones neuronales que expresan nNOS; inicialmente, entre E-5 y E-6 expresan nNOS una población de neuronas ubicadas en la región dorsolateral y, posteriormente, aparece una segunda población neuronal en la región medial de la médula espinal. La expresión de nNOS en las neuronas de la región dorsolateral coincide con la llegada de las aferencias de las proyecciones de las neuronas sensoriales (E-5). Por otro lado, la expresión de nNOS coincide con la entrada de los axones eferentes sensoriales en la materia gris a E-6. En E-7 i E-8 existe un progresivo incremento de inmunorreactividad de nNOS en el asta anterior, siendo algunas motoneuronas (MN) inmuoreactivas a nNOS, hecho que coincide con el momento en que las MN empiezan a recibir *inputs* de las conexiones aferentes descendentes, los axones sensoriales alcanzan las proximidades de las dendritas de las MN y, a su vez, tiene lugar el pico máximo de la muerte fisiológica de las MN.

P 298

PARTICIPACIÓN DE LA POLI-(ADP-RIBOSA) POLIMERASA-1 (PARP-1) EN LA MUERTE NEURONAL CAUSADA POR EL NMDA EN LA MÉDULA ESPINAL DE POLLO

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

Departament de Neurobiologia Cel·lular, Universitat de Lleida

En estudios anteriores hemos puesto de manifiesto que la administración de una dosis de NMDA *in ovo* a partir de E-8 provoca la muerte masiva de motoneuronas (MNs) y otras poblaciones neuronales de la médula espinal. Esta muerte neuronal no está asociada a la activación de caspasas, pero provoca una condensación periférica de la cromatina nuclear y un marcaje positivo para TUNEL. Entre los mecanismos que causan el efecto neurotóxico del NMDA se han propuesto, de una forma secuencial: incremento de Ca⁺⁺ intracelular, activación de la NOS, génesis de ONOO⁻, activación de la PARP-1 como respuesta a las roturas del DNA provocadas por ONOO⁻ y caída de los niveles de NAD y de ATP, lo cual provoca muerte neuronal por depleción energética. Hemos observado que, tras la aplicación de NMDA a embriones E-10, se provoca un fuerte incremento de la poliADP-ribosilación de proteínas nucleares, acontecimiento que va acompañado de una reducción significativa de los niveles de NAD⁺ y ATP. Junto con estos cambios también hemos observado una traslocación nuclear de AIF (*apoptosis inducing factor*). El tratamiento farmacológico con

7NI, inhibidor de nNOS, reduce parcialmente la poliADP-ribosilación de proteínas mientras que la 3-AB y DPQ, inhibidores específicos de PARP-1, bloquean totalmente la poliADP-ribosilación de proteínas. Los resultados preliminares indican que los inhibidores farmacológicos de PARP-1 atenúan la lesión neuronal causada por tratamiento excitotóxico con NMDA y podrían ejercer cierto efecto protector.

Enfermedad de Parkinson

P 51

C2-CERAMIDE CYTOTOXICITY IN ASTROCYTES INVOLVES THE EARLY INHIBITION OF CTP:PHOSPHOCHOLINE CYTIDYLPHOSPHOTRANSFERASE AND PROMOTES ITS REDISTRIBUTION FROM GOLGI AND ER MEMBRANES TO THE CYTOSOLIC AND NUCLEAR COMPARTMENTS

Ramos B^a, García-Andreolotti A^a, Picatoste F^a, Jackowski S^b, Claro E^a

^a Instituto de Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona.

^b St Jude Children's Research Hospital. Memphis, USA

Early inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis in astrocytes by the cytotoxic agent C2-ceramide took place with accumulation of phosphocholine and decrease of CDP-choline, consistent with the blockade of the CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT)-catalyzed step. Analysis of the subcellular distribution of CCT isozymes by western blot and indirect immunofluorescence confocal microscopy showed CCTa in Golgi structures, endoplasmic reticulum (ER), cytosol, and in the nucleus, while CCTb2 was absent in the nucleus and Golgi. Treatment with C2-ceramide promoted the increase CCTa in the cytosol and within the nucleus. These results show that inhibition of PtdCho synthesis by C2-ceramide, which is determinant for its cytotoxic action, takes place with the disturbance of membrane association of CCT isozymes, and the increased nuclear localization of CCTa.

P 52

MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN INDUCIDOS POR DOPAMINA

Gómez-Santos C^a, F. Santidrián A^a, Barrachina M^b, Gil J^a, Ferrer I^b, Ambrosio S^a

^a Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques II.

^b Unitat de Neuropatologia, Departament de Biologia Cel.lular i Anatomia Patològica, Universitat de Barcelona

La dopamina libre en el citosol celular puede tener un papel clave en los mecanismos que conducen a la degeneración neuronal y, por lo tanto, en la génesis de la enfermedad de Parkinson u otros procesos neurodegenerativos. En el presente trabajo se han utilizado células de neuroblastoma humano SH-SY5Y para estudiar el tipo de muerte celular y la activación de rutas intracelulares inducidas por dopamina. La exposición durante 24 h a dopamina 100-500 µM disminuye la viabilidad respectivamente en un 40 y 60%. zVAD.fmk, inhibidor no selectivo de caspasas, no protege este proceso. La activación de caspasa-3 es mínima y se observa fragmentación nuclear en tan sólo un 5% de las células. En cambio, en las células aún adheridas, se observan signos morfológicos de autofagia, especialmente la presencia de abundantes vacuolas citosólicas con inclusiones intravacuolares. También resulta activada la expresión de la proteína apg-3, ligada a la formación del autofagosoma. Se observa agregación mitocondrial con preservación de la funcionalidad. La membrana plasmática y el núcleo mantienen su integridad. La dopamina activa las quinasas de respuesta a estrés, JNK y p38, pero no ERK o MEK. Los efectos de la dopamina sobre la viabilidad celular se protegen significativamente con N-acetilcisteína y ácido ascórbico, parcialmente

con nomifensina, inhibidor del transporte de dopamina, con el inhibidor de la autofagia 3-metiladenina, y con los inhibidores de la JNK y p38, respectivamente SP600125 y SB203580. La dopamina incrementa también la expresión de alfa-sinucleína, la proteína más abundante en los cuerpos de Lewy, y la activación de Akt, proceso que puede estar ligado a un mecanismo de supervivencia o de diferenciación inducida por dopamina.

P 54

INTERACCIONES ANORMALES DE ALFA-SINUCLEÍNA CON RAB3a Y RABFILINA EN LA ENFERMEDAD DE LOS CUERPOS DE LEWY DIFUSA

Dalfó E^{a,c}, Barrachina M^{a,c}, Rosa JL^b, Ambrosio S^b, Ferrer I^{a,c}

^a Unitat de Neuropatologia Experimental, Departament de Biologia Cel.lular i Anatomia Patològica, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona. ^b Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona. ^c Institut de Neuropatologia, L'Hospitalet de Ll., Barcelona

El presente estudio examina las interacciones de alfa-sinucleína con rab3a y rabfilina mediante las técnicas de *arrays* de anticuerpos, inmunoprecipitación y *pull-down* en el córtex entorrinal de casos control junto con la enfermedad de los cuerpos de Lewy difusa (LB). La inmunoprecipitación con alfa-sinucleína muestra unión con rabfilina en los controles pero no en los casos LB. Además, rab3a interacciona con las fracciones de alfa-sinucleína de alto peso molecular sólo en LB, coincidiendo con los *arrays* de anticuerpos.

Se compararon estos resultados con los obtenidos en el ensayo *pull-down* utilizando rab3a, rab5 y rab8 las cuales están etiquetadas con 6 histidinas y con un epítipo flag, haciendo además el inmunoblot con anti-flag. En LB aparecen unas bandas de 17 kDa correspondientes a la sinucleína, que de forma más leve aparecen también en los controles. Así mismo sólo en LB, se observan bandas de un peso molecular mayor (36 kDa) después del pull down con rab3a, rab5 o rab8. Estos resultados corroboran estudios previos acerca de la interacción de rab3a con rabfilina en casos control, y añaden información sustancial sobre la disminución en la unión de estas dos proteínas, y del aumento de las uniones de rab3a con los agregados de alfa-sinucleína en los casos LB. Dado que tanto sinucleína, como rab3a y rabfilina participan en la liberación y fusión de las vesículas sinápticas, se puede sugerir una alteración en el procesos de exocitosis de neurotransmisores en la enfermedad LB.

P 55

ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL, NEUROGÉNESIS, NEUROTRANSMISORES Y ENVEJECIMIENTO: ESTUDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUTAMATO Y GABA EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA DESPIERTA

Segovia G^a, García A^b, García-Verdugo JM^b, Mora F^a

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. ^b Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Valencia

En el presente trabajo se estudiaron los efectos del enriquecimiento ambiental sobre la neurotransmisión en el hipocampo de la rata despierta durante el envejecimiento. Se utilizaron ratas Wistar macho (2 y 25 meses) mantenidas en condiciones de enriquecimiento ambiental o control durante 8 semanas. En la cuarta semana del experimento se les inyectó bromodeoxiuridina (40 mg/kg, 7 días) para la valoración de la neurogénesis. Nuestros resultados confirman que el enriquecimiento ambiental aumenta la neurogénesis en el hipocampo de ratas adultas jóvenes y viejas. Durante la octava semana se estudió la memoria espacial mediante el test del laberinto de Morris, observándose una mejor respuesta de los animales jóvenes, pero no viejos, mantenidos en enriquecimiento ambiental. 3-4 días tras la implantación estereotáxica de cánulas guías se llevaron a cabo experimentos de microdiálisis en el hipocampo (CA3), estudiándose las

concentraciones extracelulares de glutamato y GABA en condiciones basales y tras estimulación con K⁺ (100 mM). El enriquecimiento ambiental incrementó las concentraciones basales de glutamato, pero no de GABA, tanto en animales jóvenes como viejos. La liberación estimulada por K⁺ de GABA, pero no de glutamato, fue mayor en animales viejos mantenidos en condiciones de enriquecimiento ambiental. Estos resultados sugieren que el enriquecimiento ambiental produce cambios en la neuroquímica del hipocampo tanto en animales jóvenes como viejos. Financiación: DGINV-SAF2000-0112.

P 56

RECEPTORES CB1 PARA CANNABINOIDES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: REDUCCIÓN EN SU EXPRESIÓN Y ACOPLAMIENTO A PROTEÍNAS G

Ramírez BG^a, Guzmán M^b, De Ceballos ML^a

^a Grupo de Neurodegeneración, Instituto Cajal, CSIC. Madrid. ^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por el deterioro cognitivo de los pacientes, por la neurodegeneración en áreas corticales e hipocampo, junto con la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares. Los receptores CB1 poseen una amplia distribución en el cerebro, incluyendo corteza cerebral e hipocampo, y todas las células neurales lo expresan en alguna medida. Se ha descrito una disminución de receptores CB1 en hipocampo en la EA, a juzgar por estudios autorradiográficos y de hibridación *in situ*. Hemos estudiado los receptores CB1 en corteza frontal de pacientes de EA y de individuos control, mediante la fijación de 3H-WIN-55212-2 (WIN), fijación de 35S-GTP-gammaS estimulada por WIN y por *Western-blotting*. De acuerdo con estudios de competición con agonistas y antagonistas selectivos el WIN se une a receptores CB1 en corteza cerebral humana. La fijación específica de WIN fue similar en la EA, aunque se observó una disminución en la expresión de la proteína. Sin embargo, se obtuvo una marcada disminución (70%) en la fijación de GTPgammaS inducida por WIN en la EA, mientras que la fijación basal se redujo en mucha menor medida (25%). Los cambios no se correlacionaron ni con la edad de los sujetos ni con el retraso *post-mortem*. Resumiendo, en la EA existe una menor expresión del receptor CB1 y sobre todo en su funcionalidad, cambios que podrían ser importantes en su patología. Financiado por el MCYT (SAF 2002 01566).

P 57

EFFECTOS DE LA LESIÓN ESTRIATAL CON 6-HIDROXIDOPAMINA SOBRE LA AUTOESTIMULACIÓN DE LA CORTEZA PREFRONTAL

Ferrer JMR, Montes R, Chaatouf EH, Alba F, Vives F

Instituto de Neurociencias y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

La enfermedad de Parkinson se caracteriza clínicamente por alteraciones motoras, asociadas a trastornos psiquiátricos, cognitivos y motivacionales debido a disfunción dopaminérgica en los circuitos paralelos que conectan ganglios basales con corteza prefrontal (CPF). Nuestro estudio investigó los efectos de la lesión de la vía nigroestriatal sobre la autoestimulación de la CPF de la rata. Este paradigma conductual es utilizado ampliamente para el estudio de los mecanismos centrales de motivación y recompensa.

El estriado derecho de ratas Wistar fue inyectado con 6-OHDA (32 µg/4 µL) o vehículo. Dos meses después se realizó el test de giros ipsilaterales (lado lesión) inducido por d-anfetamina (5 mg/kg IP) con el objeto de valorar el grado de lesión producido. Posteriormente, se implantaron electrodos monopolares en la CPF de los animales, que se entrenaron para obtener autoestimulación. La actividad motora espontánea también fue analizada.

Los resultados han mostrado que los animales lesionados con 6-OHDA aprenden a autoestimularse en un tiempo similar al grupo control. Su tasa de autoestimulación es mantenida consistentemente, pero es significativamente inferior al grupo control durante todo el tiempo de experimentación (21 días). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la actividad motora espontánea de ambos grupos experimentales. Estos resultados sugieren la existencia de un déficit motivacional en este modelo de parkinsonismo experimental.

P 58

FUNCIÓN DE LOS QUIMIORRECEPTORES DEL CUERPO CAROTÍDEO EN EL ENVEJECIMIENTO

Conde SV^{a,b}, Monteiro TC^a, Obeso A^b, Monteiro EC^a, Rigual R^b, Prieto-Lloret J^b, Ribeiro JA^c, González C^b

^a Departamento de Farmacología, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal. ^b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Universidad de Valladolid. Valladolid, España. ^c Instituto de Farmacología, Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa, Portugal

El cuerpo carotídeo (CC) contiene dopamina (DA) y norepinefrina (NE) y su metabolismo muestra una clara relación con la estimulación hipóxica e hipercápica de este órgano quimiorreceptor. Se pretende investigar la función del CC en el envejecimiento. Hemos analizado los efectos de la edad sobre el metabolismo de DA y NE y sobre la respuesta ventilatoria a la isquemia, hipoxia e hipercapnia que es mediada por el CC. Los experimentos se realizaron en ratas de 3 (controles), 12, 18 y 24 meses. La edad no altera el metabolismo de NE en el CC de rata. Al contrario, los niveles de DA aumentan un 12, un 45 y un 100% a los 12, 18 y 24 meses. La liberación de DA inducida por hipoxia de PO₂>33 y >20 mmHg se reduce en un 50% y un 37% a partir de los 12 meses. La edad no afecta la liberación de DA inducida por elevado [K⁺]_e. La hipoxia (10% O₂, 10 min) y la isquemia (oclusión carotídea, 15 s) aumentan la frecuencia respiratoria más en animales viejos que en controles; la hipercapnia (5% CO₂, 10 min) aumenta la frecuencia respiratoria igual a todas las edades. El volumen corriente se redujo con la edad. Se concluye que el envejecimiento: 1) no altera el metabolismo de NE en el CC; 2) produce alteraciones en el metabolismo de DA que indican una disminución de su *turnover*; 3) produce modificaciones en la respuesta ventilatoria a la hipoxia y a la isquemia sin una relación clara con el metabolismo de DA.

Financiado por CRUP/MEC (A.I. E-41/01) y por la Fundación Calouste Gulbenkian.

P 59

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DOPPEL EN NEURITAS DISTRÓFICAS DE PLACAS SENILES EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Ferrer I, Freixes M, Blanco R, Carmona M, Puig B

Instituto de Neuropatología, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Bellvitge, Universidad de Barcelona. L'Hospitalet de Ll., Barcelona

PrP es la proteína priónica que se encuentra implicada en las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET). Doppel (Dpl) es una proteína homóloga a PrP altamente expresada en los testículos y en el corazón que se expresa durante el desarrollo en el cerebro aunque disminuye notablemente en el cerebro adulto. En ratones *knock-out* para el gen priónico PRNP, hay una sobreexpresión de la proteína Dpl, que predispone a la pérdida de las células de Purkinje y a la aparición de ataxia, aunque no produce ningún efecto sobre la modulación del *scrapie* inducido en ratones. En el presente trabajo se ha realizado el estudio de la expresión de la proteína Dpl en enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), insomnio fatal familiar (FFI), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de cuerpos de Lewy difusa (DLBD) y en pacientes control, en distintas zonas cerebrales. En cerebro control, se

observó inmunorreactividad para Dpl en células granulares del cerebelo y un patrón punteado rodeando las células de Purkinje. No se observó modificación ni en CJD ni FFI, ni en neuronas con hilillos en el neuropilo o cuerpos de Pick en AD y PiD. No obstante, sí se observó Dpl alrededor de los depósitos de amiloide de las placas seniles de AD y de la forma común de DLBD. No se detectó expresión de Dpl en neuronas con cuerpos de Lewy, ni en neuritas inmunorreactivas para alfa-sinucleína en PD y DLBD.

Este estudio demuestra por primera vez una expresión selectiva y ectópica de la proteína Dpl en placas seniles en AD.

P 60

REGULACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE TRASPLANTES DOPAMINÉRGICOS INTRAESTRIATALES. PAPEL DE LOS SISTEMAS SEROTONINÉRGICO Y NORADRENÉRGICO DEL HOSPEDADOR

Muñoz A, Rodríguez-Pallarés J, López-Real A, Guerra MJ, Labandeira-García JL

Departamento de Ciencias Morfológicas, Universidad de Santiago de Compostela

La anfetamina se utiliza habitualmente para estudiar la funcionalidad de las neuronas dopaminérgicas (DA) trasplantadas. Las respuestas de las neuronas estriales están básicamente relacionadas con la liberación de DA por el trasplante. Sin embargo, es importante conocer si esas respuestas pueden ser reguladas por las aferencias estriales del hospedador. Para ello, hemos estudiado los cambios producidos en el comportamiento rotacional y en la expresión de Fos inducida por la anfetamina en animales con denervación y trasplante DA sometidos además a lesiones del sistema serotoninérgico o pretratados con el antagonista de los receptores alfa1-adrenérgicos prazosín. Las lesiones serotoninérgicas agudas con DL-p-clorofenilalanina (pCPA) y crónicas con 5,7-dihidroxitriptamina bloquearon o redujeron respectivamente la expresión de Fos inducida por anfetamina (1 mg/kg) tanto en el estriado trasplantado como en el contralateral. En el estriado con innervación DA, el prazosín redujo significativamente la expresión de Fos sólo en presencia de innervación serotoninérgica. Sin embargo, el prazosín no disminuyó la expresión de Fos inducida por los trasplantes localizados en estriados con innervación serotoninérgica. Estos resultados sugieren que existe una integración funcional de las neuronas DA trasplantadas y el sistema serotoninérgico del hospedador para modular las respuestas de las neuronas estriales. Sin embargo, los efectos indirectos producidos por el sistema noradrenérgico sobre el estriado normal no se observaron en estriados con denervación DA y trasplantes nigrales.

Financiado por XUGA y DGSEIC(PGC).

P 61

SUPERVIVENCIA Y RESPUESTAS FUNCIONALES DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS OBTENIDAS DE NEUROSFERAS SOMETIDAS A ELIMINACIÓN DE NEURONAS SEROTONINÉRGICAS E IMPLANTADAS EN MODELOS ANIMALES DE HEMIPARKINSONISMO

Rodríguez-Pallarés J, Parga J, Rey P, López-Real A, Quiroz C, Labandeira-García JL

Departamento de Ciencias Morfológicas, Universidad de Santiago de Compostela

El uso de terapias celulares como tratamiento para la enfermedad de Parkinson (EP) conlleva una serie de limitaciones en cuanto a la disponibilidad de tejido. Por ello se plantea la obtención in vitro de células dopaminérgicas (DA) a partir de células troncales o progenitoras. Sin embargo, la supervivencia de las mismas una vez implantadas suele ser relativamente baja. En estudios previos hemos demostrado que la eliminación de la población serotoninérgica de las neuroesferas aumenta la producción in vitro de células DA. Sin embargo, es importante conocer si las neuronas DA así obtenidas pueden sobrevivir y ejercer

efectos funcionales una vez trasplantadas a estriados de modelos experimentales de EP. Hemos empleado neuroesferas de células progenitoras mesencefálicas obtenidas de embriones de rata y proliferadas en presencia de EGF. Las neuroesferas fueron prediferenciadas durante 2 h e implantadas sin disgregar en el estriado de ratas con lesiones unilaterales máximas del sistema DA. Tres meses después, los animales fueron sometidos a test de comportamiento rotacional inducido por anfetamina (5 mg/kg, IP) para evaluar la eficacia del trasplante y se observó una reducción significativa de la asimetría derivada de la lesión en los animales trasplantados. Los implantes mostraron un importante número de neuronas DA inmunorreactivas para tirosina hidroxilasa (TH-ir) y fibras TH-ir reinervando el estriado circundante. Además, la presencia de numerosos núcleos Fos-positivos en el estriado que rodea al trasplante confirmó que estas células trasplantadas no sólo sobrevivieron, sino que podían responder con la liberación de DA ante la administración de agonistas DA al hospedador. Trabajo financiado por XUGA y DGSEIC (PGC).

P 62

LA NEUROTROFINA BDNF PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LA VÍA DOPAMINÉRGICA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

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

^a *Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, IDIBAPS, Universitat de Barcelona.* ^b *Laboratorio de Neurobiología Molecular, Dept. MBB, Karolinska Institute. Estocolmo, Suecia*

La integridad de la vía nigroestriatal es fundamental para la correcta coordinación motora. En el presente estudio se analiza el papel de la neurotrofina BDNF en la regulación de esta vía en un modelo transgénico de enfermedad de Huntington. Para ello, hemos generado una cepa de animales doble mutantes, que sobreexpresan la huntingtina mutada y son deficientes en BDNF (+/-).

Los animales transgénicos para la huntingtina mutada muestran una menor respuesta a la anfetamina que los animales normales. Este efecto se agudiza en el animal deficiente en BDNF y con huntingtina mutada a la vez. Además, el análisis morfológico indica que los animales transgénicos para la huntingtina tienen una reducción de neuronas dopaminérgicas del 22 % en la sustancia negra, mientras que los dobles mutantes muestran un 41% de pérdida neuronal. No se han observado deficiencias en el número de estas neuronas en los animales BDNF +/-.

Actualmente estamos estudiando la viabilidad de la vía nigroestriatal con el trazador retrógrado, fluorogold, y los niveles de receptores D1 y D2 en estos animales.

Nuestros resultados demuestran que el BDNF tiene una gran importancia en el mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas 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.

P 63

S100b INCREMENTA LOS NIVELES PROTEICOS DE LA α -SINUCLEÍNA EN LA LÍNEA CELULAR HUMANA DE GLIOBLASTOMA U87-MG

Barrachina M^a, Dalfo E^a, Ferrer I^{a,b}

^a *Unitat de Neuropatologia Experimental, Dept. Biologia Cel.lular i Anatomia Patologica.* ^b *Institut de Neuropatologia, Hospital Universitari de Bellvitge*

La S100b es una proteína ácida de 21 kDa secretada principalmente por los astrocitos, ejerciendo un efecto autocrino y paracrino sobre la glía, neuronas y microglía. En estudios in vitro con neuronas se ha

observado que la S100b ejerce un papel neurotrófico o neurotóxico dependiendo de su concentración. Su receptor de membrana es el RAGE y tras su unión se activa la vía Ras-MAPK. En los cerebros *post-mortem* de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down hay un incremento de la proteína y del mRNA de la S100b, correlacionando su expresión con los depósitos de β -amiloides. Estamos interesados en averiguar si la S100b tiene un efecto sobre los niveles de la α -sinucleína en un modelo celular de la atrofia multisistémica. Utilizando una línea celular de glioblastoma humano denominada U87-MG, observamos que el tratamiento con 10 ng/mL y 1 μ g/mL de S100b durante 24 horas sólo reduce un 10% la viabilidad celular con la dosis de 1 μ g/mL. Al analizar los niveles de α -sinucleína por *Western blot*, detectamos un incremento de 7 y 14 veces respectivamente a las 24 horas de tratamiento con las dos dosis de S100b. En las mismas condiciones, otra proteína presináptica, la SNAP25, incrementa 14 veces y 6 veces respectivamente. Mediante RT-PCR hemos comprobado que estas células expresan el receptor RAGE sugiriendo su unión a la S100b. Además, el tratamiento con 10 ng/mL y 1 μ g/mL de S100b durante 24 horas incrementa los niveles de ERK1/2 fosforilado unas 15 y 10 veces respectivamente. Sin embargo, el tratamiento combinado de S100b y UO126, un inhibidor de MEK, no reduce los niveles de α -sinucleína detectados. Por tanto, en las células U87-MG, el tratamiento con S100b incrementa los niveles proteicos de la α -sinucleína independientemente de la activación de ERK1/2.

P 64

LA INHIBICIÓN DE CASPASAS REVIERTE LA APOPTOSIS NEURONAL INDUCIDA POR LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Cid C^a, Álvarez-Cermeño JC^b, Gómez-Calcerrada M^a, Plaza J^b, Salinas M^a, Alcázar A^a

^aServicio de Bioquímica-Investigación, Hospital Ramón y Cajal.

^bServicio de Neurología, Hospital Ramón y Cajal. Madrid

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del SNC. Nuestros estudios previos demostraron que el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM remitente-recurrente induce apoptosis en cultivos neuronales. Además, la apoptosis inducida estaba relacionada con el grado de discapacidad de los pacientes y con la densidad de sus lesiones en resonancia magnética. En la regulación de la apoptosis son esenciales las proteasas denominadas caspasas. Entre ellas, las caspasas 8 y 9 son iniciadoras en la muerte celular por apoptosis, la caspasa 3 es la ejecutora de este proceso y la caspasa 1 es necesaria en el proceso inflamatorio. En este trabajo hemos estudiado la actividad de estas caspasas en neuronas tratadas con LCR de pacientes de EM. La detección de actividad caspasa se realizó mediante su ensayo con sustratos fluorescentes específicos: YVAD-amc, DEVD-amc, IETD-afc y LEHD-afc. Además, los cultivos neuronales se trataron con inhibidores selectivos para dichas caspasas (YVAD-cmk, z-VAD-fmk, DEVD-cmk, z-IETD-fmk y z-LEHD-fmk). La posible reversión de la muerte neuronal por los inhibidores se analizó mediante los ensayos de MTT y TUNEL. Los estudios revelaron que dichos inhibidores fueron capaces, en mayor o menor grado, de bloquear la muerte neuronal inducida por LCR de pacientes de EM. Estos resultados demuestran la participación de las caspasas en la neurodegeneración en la EM y sugieren que su inhibición podría tener un interés terapéutico.

P 65

MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE LA RETINA: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

Barhoum R^a, Germain F^a, Forns N^a, De la Rosa EJ^b, De la Villa P^a

^aDepartamento de Fisiología, Universidad de Alcalá. ES. ^bCIB, CSIC

Existen diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Entre ellos, los ratones rd han sido ampliamente estudiados como modelo de enfermedad hereditaria degenerativa de la retina (EHR). Se presente caracterizar dos modelos múridos de degeneración retiniana: ratones rd1 y rd10; de forma paralela se han estudiado ratones no distróficos. Para la caracterización funcional se realizaron registros electroretinográficos (ERG) a ratones postnatales entre los días p10 y p40. Para la caracterización estructural se realizaron estudios inmunocitoquímicos de retina a distintos días de desarrollo postnatal. Se emplearon anticuerpos específicos para distintos tipos celulares de la retina (fotorreceptores, células horizontales, células de Müller).

Los ratones rd1 muestran una disminución de las respuestas electroretinográficas a partir del día p12, siendo nula la respuesta eléctrica de la retina de estos animales a día p24. Los ratones rd10 muestran respuestas ERG normales hasta día p20, mostrando a partir de entonces una disminución de sus respuestas electroretinográficas, las cuales quedan abolidas a día p40. Los estudios inmunocitoquímicos muestran la degeneración de los fotorreceptores coincide con las respuestas ERG. De forma paralela, en los ratones distróficos se observa una desestructuración de otros tipos celulares retinianos. La degeneración de los fotorreceptores en los modelos múridos de EHR conlleva una alteración en la respuesta eléctrica funcional.

P 66

LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE MPTP EN PRIMATES NO HUMANOS INDUCE UNA REACCIÓN INFLAMATORIA Y DEGENERACIÓN NEURONAL DOPAMINÉRGICA

Vázquez M, Saldise L, Garrido P, Belzunegui S, San Sebastián WE, Izal A, Luquin MR

Laboratorio de Neurología Experimental, Departamento de Neurología y Neurocirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. Pamplona

Antecedentes. La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) de la sustancia negra compacta (SNc). Esta pérdida se asocia con una respuesta glial compuesta principalmente por la activación de microglia y secundariamente por astrocitos reactivos. La respuesta glial podría causar efectos deletéreos produciendo prostaglandinas proinflamatorias al inducir la Cox-2, y citoquinas.

Objetivo. Investigar el patrón de neuroinflamación en el modelo agudo de EP inducido por MPTP en macacos.

Material y métodos. Cinco macacos a los que se administró MPTP (4 dosis IV, 0,25 mg/kg). Se procesaron 5-7 secciones de tejido con técnicas inmunocitoquímicas para: Cox-2, HLA-DR, GFAP y TH. Las secciones contenían: estriado (caudado, putamen), SN, núcleo subtalámico y pálido medial y lateral.

Resultados. Se observó una reacción microglial y astrocítica principalmente localizada en la SN en los 5 animales, siendo de menor intensidad en el estriado y el resto de núcleos estudiados. Se observaron células Cox-2 (+) en hipocampo y amígdala así como una localización de Cox-2 citoplasmática en aproximadamente un 60% de las neuronas DA nigrales (TH+).

Conclusión. Estos datos sugieren que los mecanismos inflamatorios desempeñan un papel primordial en la degeneración de las neuronas DA de la SN. Si estos resultados se confirman en el modelo de intoxicación crónica, apoyarían la utilización de antiinflamatorios en el tratamiento de la EP.

P 67**RESULTADOS A LARGO PLAZO DEL IMPLANTE ESTRIATAL DE AGREGADOS CELULARES DE CUERPO CAROTÍDEO EN MACACOS PARKINSONIANOS: ESTUDIO CONDUCTUAL Y DE PET CON 18F-DOPA**

San Sebastián W^a, Manrique M^a, Guillén J^a, Saldise L^a, Belzunegui S^a, Arbizu J^b, Ciordia E^c, Garrido P^a, Vázquez M^a, Izal A^a, Luquin MR^a

^aLaboratorio de Neurología Experimental, Departamento de Neurología y Neurocirugía, Clínica Universitaria de Navarra. ^bDepartamento de Medicina Nuclear, Clínica Universitaria de Navarra. ^cServicio de Experimentación y Producción Animal, Universidad de Navarra. Pamplona

Antecedentes. Estudios previos han demostrado que los implantes de agregados celulares de cuerpo carotídeo revierten el parkinsonismo inducido por MPTP en monos.

Objetivo. Demostrar que el beneficio motor inducido por los implantes de agregados celulares se mantiene a largo plazo y se acompaña de un incremento en la captación estriatal de 18F-dopa.

Material y métodos. En 4 macacos con parkinsonismo grave inducido por MPTP se realizó un autoimplante estriatal unilateral de agregados celulares de cuerpo carotídeo, en 1 animal el implante fue bilateral y en otro animal se inyectó vehículo unilateralmente. Se evaluaron pre y postimplante: las escalas de incapacidad motoras, test motores finos y captación estriatal de 18F-dopa.

Resultados. A las 2 semanas del implante las escalas de incapacidad funcional y los tests motores finos mejoraron en todos los animales, beneficio mantenido a lo largo de 9 meses. El PET con 18F-dopa realizado a los 6 meses del implante muestra un aumento bilateral de la captación estriatal de 18F-dopa con respecto al realizado previamente al implante.

Conclusiones. El implante estriatal de agregados celulares induce una mejoría mantenida y bilateral del parkinsonismo en monos intoxicados con MPTP y se acompaña de un incremento en la captación estriatal de 18F-dopa, lo que indica la funcionalidad del implante.

P 68**EL IMPLANTE DE AGREGADOS CELULARES DE CUERPO CAROTÍDEO INDUCE UN AUMENTO DEL NÚMERO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS ESTRIATALES EN MONOS PARKINSONIANOS**

Belzunegui S, San Sebastián W, Saldise L, Guillén J, Garrido P, Vázquez M, Izal A, Luquin MR

Laboratorio de Neurología Experimental, Departamento de Neurología y Neurocirugía, Clínica Universitaria de Navarra, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. Pamplona

Antecedentes. La administración estriatal de GDNF mediante un vector viral a macacos parkinsonianos produce un incremento significativo del número de neuronas tirosina hidroxilasa (TH) positivas en el estriado.

Objetivo. Como las células del cuerpo carotídeo contienen GDNF, hemos cuantificado el número de neuronas TH (+) estriatales en 2 macacos con implantes de agregados celulares de cuerpo carotídeo.

Material y métodos. Dos macacos parkinsonianos con implante unilateral de agregados celulares de cuerpo carotídeo, 2 macacos control y 2 macacos MPTP no tratados. Se procesaron 8 secciones estriatales para inmunocitoquímica con TH y GAD. Se cuantificó el número de neuronas TH (+) en caudado y putamen.

Resultados. El número de neuronas TH (+) en el caudado de los monos control es inferior al de los animales MPTP. En el putamen implantado fue superior al del no implantado y al de los animales MPTP. En el putamen contralateral el aumento fue significativo solamente respecto a los MPTP. El número de neuronas TH (+) en el caudado homo y contralateral al implante, fue superior al encontrado en los animales control y MPTP. Las neuronas TH (+) fueron también positivas para GAD (+) lo que indica su origen estriatal.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que el efecto del implante de agregados celulares de cuerpo carotídeo puede deberse a una liberación de GDNF por parte de las células implantadas y a la proliferación de neuronas dopaminérgicas estriatales inducida por factores tróficos.

P 69**ESTUDIO DEL SITIO DE INICIACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN A LO LARGO DEL EJE SOMATODENDRÍTICO DE NEURONAS PIRAMIDALES MEDIANTE MODELOS COMPARTIMENTALES**

Ibarz JM, Herreras O

Dept. de Investigación, Hospital Ramón y Cajal. Madrid

El concepto clásico que establecía un sitio único de inicio del potencial de acción (PA) en el segmento inicial del axón ya no es aceptable. Varias subregiones de la morfología neuronal pueden iniciar o conducir PAs. La investigación experimental de las propiedades dendríticas no-lineales está sujeta a error dada su fuerte dependencia de las condiciones invasivas de registro. Hemos utilizado un modelo compartimental realista de morfología promedio, previamente ajustado mediante optimización guiada experimentalmente (Varona et al. J Neurophysiol 2000; 83: 2192. López-Aguado et al. J Neurophysiol 2002; 88: 2809), para examinar los factores que modulan el sitio de iniciación del PA en las neuronas piramidales hipocámpicas. Nuestros resultados indican que la concentración de entrada excitadora en una subregión dendrítica reducida inicia PAs dendríticos propagados con más efectividad que entradas espacialmente dispersas de magnitud equivalente. Entradas muy distales pueden iniciar PAs que abortan su propagación, pero que pueden regenerar un PA en el axón. La distancia eléctrica media entre la entrada dendrítica y la zona de inicio en el axón también determina el sitio de inicio, pero puede ser modulado por un buen número de factores, fundamentalmente la excitabilidad relativa de las dos regiones iniciadoras. Los cambios del sitio inicial del PA indican varios modos de operación computacional global en estas células.

Financiado por PB98/1639 y BEFI02/1767.

P 70**NEUROINFLAMACIÓN CRÓNICA Y NEURODEGENERACIÓN POR SOBREEXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE LA IL-6. FUNCIÓN DE LAS METALOTIONEÍNAS**

Molinero A, Giralt M, Carrasco J, Hernández J, Camats J, Lago N, Hidalgo J

Instituto de Neurociencias y Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Unidad de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona

Los procesos inflamatorios están relacionados con diversas patologías degenerativas del sistema nervioso central. Algunas citoquinas y los radicales libres están implicados en estas patologías, siendo la IL-6 una citoquina de papel relevante en el control de la reactividad glial. Ratones que sobreexpresan la IL-6 bajo control del promotor del gen de la proteína ácida fibrilar glial muestran un síndrome progresivo neurológico muy característico con neurodegeneración, astrocitosis, microgliosis, angiogénesis y regulación al alza de varios genes entre los que se encuentran los de las metalotioneínas I y II.

Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteínas y que ligan metales, Cu y Zn en condiciones fisiológicas. Se ven alteradas en diversas enfermedades neurodegenerativas, así como en diferentes modelos animales de neurodegeneración. A su función en el metabolismo del Cu y el Zn se le añaden otras de índole variada: detoxificadoras, antioxidantes, neuroprotectoras etc.

Evaluaremos los resultados obtenidos a partir del estudio de distintos modelos animales con expresión constitutiva de la IL-6 y los relacionaremos con la posible función protectora de las metalotioneínas I

y II en el SNC, analizando marcadores de inflamación y neurodegeneración por técnicas inmunohistoquímicas y de expresión génica (RPA).

P 71

DEGENERACION NEURONAL DEL NÚCLEO PEDUNCULOPONTINO EN MACACOS PARKINSONIANOS CON PALIDOTOMÍA POSTEROVENTRAL

Guillén J^a, Saldise L^b, Iglesias E^a, San Sebastián W^b, Belzunegui S^b, Garrido P^b, Vázquez M^b, Izal A^b, Luquin MR^b

^aServicio de Experimentación Animal, Universidad de Navarra. ^bLaboratorio de Neurología Experimental, Departamento de Neurología y Neurocirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. Pamplona

Antecedentes. La palidotomía produce una mejoría de las discinesias inducidas por L-dopa en pacientes con enfermedad de Parkinson (EP). El globo pálido medial (GPM) envía numerosas proyecciones al núcleo pedunculopontino (PPN) que tiene una función motora reconocida. **Objetivo.** Determinar si la palidotomía induce alteraciones morfológicas del PPN.

Material y métodos. Cinco macacos con parkinsonismo y palidotomía unilateral, 2 macacos parkinsonianos con palidotomía bilateral y uno control. La palidotomía produjo discinesias coreicas y mejoría del parkinsonismo en el lado contralateral a la lesión. La cuantificación de las neuronas del PPN se realizó en 12-14 secciones que contenían ambos PPN, procesadas con NADPH-diaforasa y utilizando un analizador de imágenes.

Resultados. En los animales con palidotomía unilateral el número de neuronas NADPH (+) del PPN homolateral a la lesión fue significativamente inferior con respecto al del PPN contralateral y al del PPN del animal control. En los animales con palidotomía bilateral, la depleción neuronal fue similar en ambos PPN y el número de neuronas significativamente inferior al del animal control. La intensidad de la degeneración del PPN se correlacionó con el grado de lesión del GPM.

Conclusiones. La palidotomía produce una degeneración neuronal del PPN homolateral probablemente secundaria a la degeneración de las neuronas del GPM que proyectan al PPN. Estos hallazgos cuestionan la utilidad de esta técnica en el tratamiento de la EP.

P 72

CARACTERIZACIÓN DE LAS CELULAS DE CUERPO CAROTÍDEO DE RATA EN CULTIVO

Cemborain A^b, Izal A^a, Saldise L^a, Belzunegui S^a, San Sebastián W^a, Vázquez M^a, Garrido P^a, Gutiérrez M^b, Prósper F^b, Luquin MR^a

^aLaboratorio de Neurología Experimental, Departamento de Neurología y Neurocirugía, Clínica Universitaria de Navarra, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. ^bDepartamento de Terapia Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra. Pamplona

Antecedentes. Los implantes de agregados celulares de cuerpo carotídeo reversion los déficits motores en modelos de enfermedad de Parkinson (EP). Sin embargo, los mecanismos implicados en la recuperación motora e inervación dopaminérgica estriatal se desconocen.

Objetivo. Caracterizar los tipos celulares que existen en el cuerpo carotídeo de la rata y concretamente si en el cuerpo carotídeo existen células con capacidad de diferenciarse hacia células neurales.

Material y métodos. Se extrajo el cuerpo carotídeo de rata y tras una disgregación celular se cultivó en un medio similar al que se utiliza para las células MAPC (células adultas multipotenciales obtenidas de médula ósea). La identificación de la población celular se realizó mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo.

Resultados. Las células de cuerpo carotídeo cultivadas en este medio de cultivo, muestran una alta capacidad de proliferación y supervivencia a largo plazo. Estas células resultan positivas inmunocitoquímicamente

para marcadores de células neurales inmaduras (80 % para Tuj-1 y 30% para Nestina y PSA-NCAM). Además, estas células expresan marcadores de células mesenquimales en un 80-90% mediante citometría de flujo (HLA-1, CD73, CD90 y CD44).

Conclusiones. Estos resultados sugieren que en el cuerpo carotídeo podría existir una población de células con capacidad de diferenciación hacia células neurales, lo cual ampliaría las posibilidades de utilizar estas células en el tratamiento de la EP.

P 73

LA FLUOXETINA PREVIENE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR MDMA EN RATAS Y SU POTENCIACIÓN POR MALONATO

Goñi-Allo B, Ramos M, Lasheras B, Del Río J, Aguirre N
Departamento de Farmacología, Universidad de Navarra. Pamplona

La administración de 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA, «éxtasis») produce una degeneración selectiva de las terminales nerviosas serotoninérgicas de distintos núcleos del cerebro de la rata. Recientemente ha sido sugerido que la continua liberación de serotonina (5-HT) inducida por la MDMA, produciría un incremento intracelular de Na⁺ que activaría la Na/K ATPasa. Este hecho conduciría al agotamiento de los depósitos energéticos intracelulares y posteriormente a la degeneración de la terminal nerviosa. Basándonos en dicha hipótesis, administramos intraestriatalmente malonato (3 mM), inhibidor del enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, junto con una única inyección de MDMA (15 mg/kg IP). Siete días después las ratas fueron sacrificadas y la concentración estriatal de 5-HT y DA fue cuantificada por HPLC. La combinación malonato/MDMA produjo una potenciación significativa de la pérdida de 5-HT inducida por MDMA y una mayor pérdida de DA que la inducida por malonato. Con el fin de bloquear la salida masiva de 5-HT desde la terminal, otro grupo de animales fue tratado con fluoxetina (10 mg/kg IP) media hora antes de la combinación malonato/MDMA. Dicho pretratamiento no sólo previno la potenciación de la pérdida de DA inducida por la combinación malonato/MDMA sino que revirtió completamente los déficit serotoninérgicos inducidos por ambas drogas. Estos resultados parecen apoyar, por tanto, la hipótesis de partida.

Financiado por EC; QLG3-CT2002-00809.

P 74

EL AMONIO PREVIENE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR GLUTAMATO PERO NO LA INDUCIDA POR DEPLECIÓN DE POTASIO, EN NEURONAS DE CEREBELO EN CULTIVO

Llansola M^a, Boscá L^b, Hortelano S^b, Felipo V^a

^aLaboratorio de Neurociencia, Instituto de Investigaciones Citológicas de la FVIB, Valencia. ^bInstituto de Bioquímica, Universidad Complutense de Madrid

La incubación con glutamato a bajas concentraciones (1-10 μ M) o la depleción de potasio (K⁺) conducen a la muerte de las neuronas granulares de cerebelo en cultivo por apoptosis. Sin embargo no se conoce en detalle el mecanismo por el cual se produce la apoptosis en cada caso ni si el mecanismo implicado es el mismo o es diferente para cada situación. En este trabajo mostramos que la exposición crónica a amonio previene la apoptosis inducida por el glutamato pero no la inducida por depleción de K⁺, sugiriendo que al menos en algún paso el mecanismo de apoptosis es distinto en cada caso.

La exposición de las neuronas de cerebelo en cultivo a amonio 100 μ M previene el aumento de calcio intracelular, la despolarización de la membrana mitocondrial interna, la liberación de citocromo C de la mitocondria al citosol, la activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA inducidas por glutamato 5 μ M. Sin embargo la exposición al amonio no previene la activación de caspasa-3 o fragmentación del DNA inducidos por depleción de K⁺.

Estos resultados indican que los pasos iniciales del mecanismo apoptótico son diferentes según la apoptosis sea inducida por glutamato o por depleción de K⁺.

También se muestra que la exposición crónica a amonio 100 µM previene la apoptosis inducida por el glutamato porque previene el aumento inicial de calcio intracelular inducido por el glutamato, evitando la activación de los procesos posteriores implicados en el mecanismo de apoptosis.

P 75

PAPEL DE LAS CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL TRAS LESIÓN

Quintana A, Camats J, Giralt M, Hidalgo J, Molinero A
Instituto de Neurociencias, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona

La criolesión es un modelo de lesión en la corteza cerebral que provoca una respuesta inflamatoria en la zona afectada así como en áreas adyacentes. En esta respuesta se observa la infiltración de células hematopoyéticas, astrogliosis, microgliosis, un incremento de la apoptosis y de la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias. El papel de las diferentes citoquinas proinflamatorias se ha abordado mediante el uso de ratones deficientes (*knock-out*) para la interleuquina 6 (IL-6KO), para el receptor 1 del TNFα (TNFαR1KO) y para el receptor 2 del TNFα (TNFαR2KO).

Se ha evaluado el estado neurohistológico de los animales en presencia/ausencia de estas citoquinas tras la lesión mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas. Además se ha estudiado la expresión de diferentes genes relacionados con el desarrollo de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central (ICAM-1, Mac1, iNOS, EB22, GFAP), así como de marcadores apoptóticos (FAS, RIP, p53, ICE, bcl-2), citoquinas (TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6) y neurotrofinas (BDNF, NGF) mediante RPA (*ribonuclease protection assay*).

Con este estudio pretendemos abordar de una manera global el papel de la interleuquina-6 y el del TNFα en la respuesta inflamatoria en un modelo de lesión en el sistema nervioso central.

Sistemas sensoriales

P 77

LA INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS INCREMENTA EL NÚMERO DE NEURONAS EN EL LOCUS COERULEUS DE LA RATA

Pinos H^a, García-Falgueras A^a, Fernández R^b, Pásaro E^b, Collado P^a, Guillaumon A^a

^aDepartamento de Psicobiología, Universidad Nacional de Educación a Distancia. ^bDepartamento de Psicobiología, Universidad de A Coruña

En trabajos previos hemos demostrado que el *locus coeruleus* es una estructura sexualmente dimorfa en la que las hembras presentan mayor volumen y número de neuronas que los machos y que este dimorfismo depende de la presencia de estradiol en la hembra. También hemos comunicado a la literatura que los andrógenos podrían inhibir la diferenciación sexual neuronal de estructuras cerebrales que presentan el mismo patrón de diferenciación que el *locus coeruleus*. El *locus coeruleus* contiene receptores para andrógenos y estrógenos. En el presente experimento verificamos esta hipótesis comparando el *locus coeruleus* de ratas macho y hembra que presentan una mutación en el gen que codifica el receptor de andrógenos (ratas Tfm) con sus hermanos (controles) que no presentan dicha mutación. La mutación produce que el 85-90% de los receptores de andrógenos no sean funcionales.

El número de células en el *locus coeruleus* de los machos Tfm es similar al de las hembras Tfm y las hembras control. Sin embargo, el número de neuronas en el *locus coeruleus* de los machos controles resulta significativamente menor que el de los machos Tfm ($p < 0.05$) y las hembras control ($p < 0.05$). Estos resultados indican que al disminuir la sensibilidad a los andrógenos (machos Tfm) se incrementa el número de células en el *locus coeruleus*. Este hallazgo apoya nuestra hipótesis en la que señalamos que los andrógenos tienen una función inhibitoria en el patrón de dimorfismo sexual en el que la hembra presenta más neuronas que el macho.

Este trabajo ha sido financiado por: BOS2000-0145.

P 78

ESTUDIO DE LA INTEGRACIÓN DE ESTÍMULOS SENSORIALES DE DIFERENTE MODALIDAD EN EL HIPOCAMPO DE RATAS ANESTESIADAS

Sánchez-Jiménez A^a, Fernández-Verón R^b, Largo C^c

^aDepartamento de Matemática Aplicada, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. ^bDepartamento de Matemática Aplicada, E.U. de Óptica, Universidad Complutense de Madrid.

^cFacultad de Ciencias Experimentales y Técnicas, Universidad San Pablo CEU

El hipocampo (HPC) es un importante centro de integración sensorial multimodal y, aunque se sabe que la actividad rítmica theta (3-12 Hz) juega un papel fundamental en el procesamiento de este tipo de información, se desconocen aún los principios básicos de dicho procesamiento. En el presente trabajo se estudia la respuesta del HPC ante estimulaciones sensoriales de diferente modalidad así como la modulación que el ritmo theta ejerce sobre su integración. Los datos se obtuvieron a partir de ratas jóvenes adultas Wistar anestesiadas con diferentes fármacos y bajo diferentes niveles de profundidad anestésica. Mediante estereotaxia se posicionaron electrodos de registro unitarios y múltiples en la región CA1 del HPC. Se estudiaron dos modalidades sensoriales: visual y somatosensorial. En CA1 existen neuronas unimodales y multimodales. El estudio de las multimodales ante estímulos sensoriales simultáneos indica que dichas neuronas se encargan de la integración de información de diferente modalidad en función de sus características básicas. El análisis de la función del ritmo theta revela que éste está implicado en la codificación e integración de la información sensorial que llega al HPC.

P 80

PARTICIPACIÓN DE LAS CÉLULAS INVERTIDAS EN EL ÁREA LÍMBICA DEL CONEJO (NEW ZEALAND)

Fuentes M, Mendizábal-Zubiaga JL, Alejo A, Pró-Sistiaga P, Reblet C, Bueno-López JL

Departamento de Neurociencias, Universidad del País Vasco

En las conexiones córtico-corticales las células invertidas proyectantes se han visto principalmente en la proyección hacia atrás en la corteza visual, entre áreas asociativas temporales y en el área asociativa visual-somatosensorial (V-SM). En este trabajo hemos analizado la participación de estas células en las conexiones de las áreas límbicas anteriores (8 y 32) por ser éstas áreas asociativas. Conejos adultos recibieron inyecciones iontoforéticas o por presión de 1% de toxina colérica b(Ctb) en dichas áreas. Las inyecciones iontoforéticas se situaron en una pequeña porción del área 8. Rostralmente, el marcado se localizó en las áreas 24 y en la parte medial del área 32 donde aparecía un elevado número de células invertidas en capas infragranulares. Más caudalmente el marcado retrógrado se localizaba en el área SMI, donde también se marcaron células invertidas. Las inyecciones de Ctb por presión abarcaron la parte anterodorsal del área 32 y el área 8. El marcado fue localizado en las mismas áreas, aunque el número de células marcadas fue mayor. También en estas inyecciones encontramos

células invertidas. Aparecieron además otras células marcadas en el área V-SM, área 17 y en la amígdala basolateral. Estos resultados sugieren que la proyección al área límbica anterior desde estas áreas procede del área 32 o que tienen una proyección divergente al área 8 o al área 32. Las células invertidas participan en gran número en las conexiones córtico-corticales estudiadas.

Proyectos 9/UPV/EHU 00212.327-12090 y MCT BSA2001-1179.

P 81

MODELO MATEMÁTICO DE INTEGRACIÓN DE LA ACTIVIDAD SENSORIAL EN EL HIPOCAMPO

Makarov V^a, Sánchez-Jiménez A^b, Panetsos F^a

^a Dept. de Biomatemática, Escuela de Óptica, Universidad Complutense de Madrid. ^b Dept. de Biomatemática, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. Madrid

La información sensorial, una vez procesada en diferentes áreas de la corteza, llega al hipocampo, donde se utiliza de nuevo para modular la información sensorial de diferente origen que llega posteriormente. Este procesamiento adicional que sufre la información sensorial es imprescindible para poder ser utilizada por el hipocampo en las funciones cerebrales de alto nivel en las que está involucrado. Los mecanismos mediante los cuales se realiza esta fusión de información se desconocen todavía, aunque los datos experimentales sugieren que ciertas oscilaciones lentas de la membrana neuronal juegan un papel primordial. Proponemos un modelo (matemático y computacional) de red neuronal organizada en dos niveles que utiliza oscilaciones subumbrales para el procesamiento de estímulos sensoriales. Las neuronas del primer nivel pueden descomponer las señales entrantes en sus componentes oscilatorios básicos que pueden ser filtrados o modulados por otras estructuras cerebrales. Así, los componentes de la señal que llevan información de gran importancia, pero que presentan una baja intensidad en el total son amplificados en este nivel. En el segundo nivel, se genera la señal de salida definitiva que se origina de la integración de los componentes de mayor importancia de la de entrada. El modelo es robusto al ruido y muestra una gran sensibilidad a estímulos significativamente diferentes. Estos resultados teóricos son compatibles con los datos experimentales obtenidos en el hipocampo.

P 82

EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CÉLULAS MADRE Y NEURONALES RETINIANOS EN CÉLULAS EN PROCESO DE DIFERENCIACIÓN EN EL CUERPO CILIAR Y LA RETINA PERIFÉRICA DE MAMÍFEROS ADULTOS

Cuenca N^a, Martínez-Navarrete GC^b, Angulo A^c, Bellot JL^c, Martín-Nieto J^b

^a Dpto. Biotecnología, Universidad de Alicante. ^b Dpto. Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante. ^c Dpto. Interuniversitario de Óptica, Universidad de Alicante

Recientemente se han identificado en cultivo células del cuerpo ciliar de roedores adultos que expresan nestina, un marcador de células madre neuroectodérmicas, las cuales pueden generar *in vitro* los distintos tipos neuronales y gliales de la retina. El propósito del presente estudio ha sido la identificación de células madre-progenitoras y en vías de diferenciación en el cuerpo ciliar y en la retina periférica en distintas especies de mamíferos adultos. Para ello, secciones de criostato de retinas de mono, humana y bovina se sometieron a inmunotinción con anticuerpos contra la nestina y distintos marcadores de neuronas retinianas (rodopsina, arrestina, GCAP-1, calbindina, calretinina, parvalbúmina, GABA, TH y ChAT) y células de Müller (CRALBP). Hemos identificado células que expresan nestina localizadas en la *pars plana* del cuerpo ciliar, así como en la zona periférica de la retina adyacente a la ora serrata. Estas últimas células presentan en la retina

humana morfología similar a células de Müller, aunque no expresan CRALBP. En esta zona hemos observado, en las tres especies estudiadas, células con morfología indiferenciada que expresan marcadores específicos de los distintos tipos neuronales retinianos. Los resultados obtenidos sugieren que la zona comprendida entre la *pars plana* y el inicio de la retina periférica constituye una región donde tiene lugar la diferenciación de células madre del cuerpo ciliar en los distintos tipos celulares de la retina en mamíferos adultos.

Subvencionado por: Generalitat Valenciana (CTIDIB/2002/146) y Universidad de Alicante (GR02-11).

P 83

RESPUESTA DE LAS PROYECCIONES DOPAMINÉRGICAS Y GABÉRGICAS MESOESTRIATALES A LA LESIÓN DOPAMINÉRGICA CONTRALATERAL

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

^a Dpto. de Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna.

^b Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna.

^c Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife

Aunque la dopamina (DA) es el principal neurotransmisor en la vía mesoestriatal, existen dos proyecciones gabérgicas nigroestriatales: una desde neuronas inmunorreactivas a GABA, GAD67 y PV de la sustancia nigra reticulata (células GABA nigroestriatales) y otra desde una subpoblación de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta y el área tegmental ventral que en condiciones normales contienen RNAm de GAD65 pero no son inmunorreactivas para GABA ni GAD65 (células DA/GABA nigroestriatales). Nosotros hemos estudiado la respuesta de estos tres componentes (DA-, GABA- y DA/GABA) tras la lesión dopaminérgica contralateral con técnicas neurofisiológicas y morfológicas. Nuestros hallazgos muestran que tras la lesión dopaminérgica contralateral: 1) el número de células GABA nigroestriatales aumenta del 6% al 17% del total de células nigroestriatales; 2) las células DA/GABA se hacen positivas a GABA y GAD65, y 3). aumenta la velocidad de disparo y la actividad en ráfagas de las neuronas dopaminérgicas, pero no de las que proyectan al estriado, que pueden estar bajo la influencia de la hiperactividad gabérgica. Esto sugiere que los componentes gabérgicos de la proyección mesoestriatal pueden ejercer un papel regulador sobre el componente dopaminérgico, activado o reforzado tras la lesión contralateral, y dirigido probablemente a restaurar la simetría funcional en los ganglios basales y evitar la progresión de la degeneración en las neuronas dopaminérgicas contralaterales en la enfermedad de Parkinson.

P 84

REORGANIZACIÓN DE CIRCUITOS INHIBIDORES EN LA EPILEPSIA: CAMBIOS EN LAS CÉLULAS EN CANDELABRO EN EL HIPOCAMPO HUMANO ESCLERÓTICO

Arellano JI^a, Muñoz A^a, Ballesteros-Yáñez I^a, Sola RG^b, DeFelipe J^a

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

^b Departamento de Neurocirugía, Hospital de la Princesa. Madrid

Hemos estudiado la distribución y características neuroquímicas de las células en candelabro en el hipocampo esclerótico de pacientes con epilepsia de lóbulo temporal, empleando como marcadores anticuerpos dirigidos contra el transportador 1 de GABA (GAT-1), contra la proteína de adhesión N-CAM polisializada (PSA-NCAM) y contra las proteínas fijadoras de calcio parvalbúmina (PV) y calbindina (CB). En el hipocampo normal, los terminales en candelabro inmunoreactivos para GAT-1 y PV se localizan en el estrato de células principales de todos los campos de la formación del hipocampo, mientras aquellos inmunoreactivos para CB y PSA-NCAM se localizan exclusivamente en la parte superficial del estrato piramidal del subículo. En el hipocampo esclerótico, existe una profunda reorganización morfológica y

neuroquímica de las células en candelabro: en zonas discretas del giro dentado y del asta de Amón, se observan terminales en candelabro complejos, compuestos de varios axones y múltiples botones en torno al segmento inicial del axón de las células principales. Estos terminales son inmunorreactivos para PV, y en algunas zonas del giro dentado y de los campos CA2 y CA1, son inmunorreactivos para CB.

Estos cambios en la morfología y neuroquímica de los terminales en candelabro sugiere que los circuitos inhibidores del hipocampo humano son susceptibles de plasticidad en relación a procesos patológicos y pueden desempeñar un papel relevante en la patofisiología de la epilepsia.

P 85

UN MECANISMO SINÁPTICO COLINÉRGICO QUE EXPLICA LA FIJACIÓN OCULAR

Navarro JD^a, Alvarado JC^{a,b}, Escudero M^c, Delgado-García JM^a, Yajeya J^b

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

^bDepartamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, INCyL, Universidad de Salamanca. Salamanca. ^cDepartamento de Fisiología y Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Sevilla

Se ha estudiado *in vitro* e *in vivo* la generación de la actividad neuronal persistente que permite la fijación de la posición del ojo en la órbita tras la realización de un movimiento ocular. Se obtuvieron rodajas de tronco del encéfalo de ratas de un mes, incluyendo el núcleo *prepositus* (NP) y la formación reticular paramedial del puente (FRPP). Se realizó el registro intracelular de las neuronas del NP y de su activación sináptica desde la FRPP. Un pulso eléctrico aplicado a la FRPP produjo la activación monosináptica de neuronas del NP, a través de receptores AMPA-kainato. Estímulos de 50-200 Hz y 100 ms produjeron despolarizaciones tardías y duraderas de neuronas del NP, cuya amplitud y duración se relacionó linealmente con la frecuencia del estímulo. Este último efecto se bloqueó con atropina y pirenzepina (dos antagonistas colinérgicos) y se reprodujo con carbachol (un agonista colinérgico). El carbachol aplicado al baño también redujo la liberación de glutamato por los terminales de las neuronas de la FRPP. Microinyecciones de pirenzepina en el NP de un gato despierto y alerta produjeron un déficit en el mantenimiento de la posición ocular, desliziéndose el ojo de forma exponencial hacia el lado de la inyección. La aplicación de carbachol en el NP del gato despierto produjo el efecto opuesto, con una desviación del ojo hacia el lado contralateral a la inyección, sobre todo en oscuridad. Estos hallazgos sugieren que la actividad neuronal sostenida característica de las neuronas del NP durante fijaciones oculares resulta de la acción conjunta de señales neuronales de velocidad ocular, provenientes de la FRPP y de la acción facilitadora de terminales colinérgicos de origen aún no determinado.

Realizado con ayudas de JA/CVI-122 y DGICYT (BF12002-00936).

P 86

GENERACIÓN DE ACTIVIDAD RÍTMICA EN CORTEZA OLFATORIA *IN VITRO*

Gallego R, Figueroa A, Descalzo VF, Sánchez-Vives MV

Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC. Alicante

En estudios previos hemos descrito una preparación de corteza cerebral *in vitro* que genera actividad rítmica espontánea (<1 Hz) similar a la que ocurre *in vivo* durante el sueño de onda lenta (Sánchez-Vives y McCormick. Nat Neurosci 2000; 3: 1027). Esta preparación nos permite estudiar cómo las propiedades intrínsecas y sinápticas de la red neuronal cortical interactúan generando patrones de actividad. Aquí hemos estudiado la generación de actividad rítmica espontánea en la corteza olfatoria, precursora de la neocorteza y que mantiene una segregación de las aferencias periféricas y las conexiones córtico-corticales. Registros extracelulares en la corteza olfatoria del hurón

muestran una elevada actividad espontánea basal, organizada en una variedad de patrones rítmicos que van desde la oscilación de <1 Hz hasta patrones epilépticos. Una diferencia fundamental observada es que la velocidad de propagación es de unos 100 m/s, un orden de magnitud mayor que la de las oscilaciones en neocorteza. Alta actividad espontánea basal, tendencia a la epilepsia y alta velocidad de conducción sugieren un balance inhibición/conectividad recurrente excitatoria disminuido respecto a la neocorteza. En la actualidad estudiamos la implicación de ambos factores en la determinación de las características de la actividad rítmica y cómo ésta es modulada por la estimulación eléctrica de las aferentes sensoriales frente a las conexiones corticales recurrentes.

Financiado por HFSP RGP0025/2002-C y MCYT BF12002-03643.

Neurotransmisores

P 87

EFFECTOS DEL TOLUENO SOBRE EL INMUNOMARCAJE DE GALANINA EN EL HIPOTÁLAMO DE LA RATA

Morón L^a, Pascual J^a, Echevarría E^a, Portillo MP^b, Macarulla MT^b, Zárate J^a, Abecia LC^c, Casis L^a

^aDepartamento de Fisiología, Universidad del País Vasco. ^bDepartamento de Nutrición y Bromatología. ^cDepartamento de Salud Pública

La galanina es un neuropéptido orexigénico que participa en la regulación hipotalámica del apetito. Por otra parte, el tolueno es un agente neurotóxico ampliamente utilizado en la industria y como droga de abuso inhalatoria, que ejerce una acción anorexígena. En base a ello, el objetivo de este trabajo fue describir el efecto de la exposición aguda (4 días) y crónica (14 días) a tolueno (1,3 mL/kg/día, IP) sobre la expresión hipotalámica regional de galanina en la rata. Para ello, se realizó un estudio inmunocitoquímico, empleando la técnica de la avidina peroxidasa y utilizando 3,3'-diaminobencidina como cromógeno, cuyos resultados fueron interpretados con la ayuda de un equipo computarizado de análisis de imagen. Las diferencias estadísticas se consideraron en base al test t de Student ($p < 0,05$). La administración aguda de tolueno produjo un incremento significativo en el número de células nerviosas marcadas para galanina a nivel de los núcleos arqueado, paraventricular y supraóptico, así como en las áreas preópticas medial y lateral, sin cambios en los núcleos dorsomedial, ventromedial, periventricular y supraóptico. Sin embargo, la administración crónica (14 días) no generó cambios en ninguna de las regiones analizadas, excepto una reducción en el núcleo supraóptico. Estos resultados sugieren la implicación de la galanina en el mecanismo anorexígeno del tolueno. Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno Vasco (PI-1999-51).

P 88

REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR EN SINAPSIS SILENTES Y FUNCIONALES EN HIPOCAMPO

Cabezas C, Buño W

Instituto Cajal, CSIC. Madrid

La liberación de neurotransmisor, sus propiedades y regulación así como la plasticidad a corto plazo en las sinapsis entre las colaterales de Schaffer (SCs) y las neuronas piramidales de CA1 pueden ser de gran importancia funcional en el hipocampo.

Utilizando estimulación mínima, que activa una o muy pocas sinapsis, realizamos el estudio *in vitro*, en rodajas de hipocampo de rata, de la amplitud, el número de fallos y la facilitación por pares de pulsos (PPF) de las corrientes postsinápticas excitadoras (EPSCs) en las SCs y su modificación por el agonista colinérgico carbamilcolina (CCh). Hemos encontrado que:

1) En las sinapsis funcionales existe mayor PPF que en las silentes. La PPF en las sinapsis funcionales es causada por un mayor número de fallos en R1 que en R2 (1° y 2° EPSC), y por una mayor amplitud de R2. 2) CCh incrementa el número de fallos en R1 más que en R2 y reduce la amplitud de R2 en las sinapsis funcionales y no modifica las silentes. Estos resultados sugieren que CCh reduce selectivamente la probabilidad de liberación y el contenido vesicular en las sinapsis funcionales y no en las silentes. Esto es consistente con que las SCs tienen dos tipos distintos de terminales con características de liberación distintas, unas presentan mayor capacidad de plasticidad a corto plazo y gran sensibilidad a la regulación muscarínica y otras tienen menos plasticidad y baja sensibilidad a esta regulación. Financiado por DGICYT, MEC (PM980113) y MCYT (BFI2002-01107).

P 89

REGULATION OF CELL SURFACE DOPAMINE D2 RECEPTOR DENSITY

Khan Z, Gutiérrez A

^a Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga.

^b Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Málaga

Spliced Galphai2 (sGi2) protein is a C-terminal splice variant of heterotrimeric Galphai2 protein. Unlike Galphai2, the sGi2 protein is not localized on plasma membrane, instead it was found in intracellular compartments. Galphai2 protein contains a dopamine D2 receptor interaction site to participate in receptor-mediated signal transmission. However in contrary, sGi2 protein does not participate in seven transmembrane receptor signalling and is likely to be involved in other cellular functions. Here, we report that sGi2 plays a crucial role in controlling dopamine D2 receptor density on the plasma membrane. Receptor activity of both D2 short (D2S) and D2 long (D2L) isoforms in whole cell was significantly reduced when co-expressed with sGi2. The reduction in receptor activity was dependent on the sGi2 protein concentration. Co-expression of sGi2 with either D2S or D2L receptors led to intracellular accumulation of both proteins. And affinity-purification of these complexes revealed the presence of sGi2 protein and D2 receptors, further demonstrating a specific intracellular interaction between these two proteins. Therefore, we suggest that this mechanism could serve as a cellular strategy to retain D2 receptors intracellularly and prevent them from reaching to the plasma membrane.

This work was supported by Ramón y Cajal program from MCYT.

P 90

TRANSMODULACIÓN DE RECEPTORES DE ADENOSINA TRAS EXPOSICIÓN CRÓNICA A AGONISTAS SELECTIVOS

Ruiz MA, León D, Villar G, Iglesias I, Albasanz JL, Martín M

Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica,

Facultad de Química, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas.

Ciudad Real

La adenosina es un nucleósido distribuido a nivel central y periférico. En el SNC, actúa como neuromodulador, regulando la liberación de neurotransmisores excitatorios, como glutamato. A nivel periférico tiene efecto protector ante situaciones de hipoxia/isquemia. Las diferentes acciones de la adenosina están mediadas por su unión a receptores de membrana, fundamentalmente A1 y A2, acoplados a través de proteínas G a la adenilato ciclasa (AC) de manera inhibitoria y estimuladora, respectivamente. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación de estos receptores en cerebro de ratas tras la administración crónica de agonistas selectivos, como R-PIA y NECA. El tratamiento con NECA produjo una desensibilización de los receptores A2, asociada a una disminución en los niveles de alfaGs,

sin producir variaciones en los niveles de receptores A2 en membranas. Sin embargo, dicho tratamiento disminuyó significativamente la población de receptores A1 de alta afinidad, sin afectar la capacidad de inhibición de la AC producida por CHA, ni los niveles de alfaGi acoplados a los mismos. Por otro lado, el tratamiento con R-PIA produjo una disminución significativa en los niveles de receptores A2 de baja afinidad, sin afectar la capacidad de estimulación del NECA sobre la AC. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos de transmodulación entre las vías de transducción mediadas por los receptores A1 y A2 de adenosina tras la exposición crónica a agonistas.

P 91

INCREMENTO DE LA ACTIVIDAD NITRÉRGICA DURANTE EL ESTRO EN EL NÚCLEO DE LA AMÍGDALA MEDIAL ANTEROVENTRAL EN LA RATA

Carrillo B^a, Panzica GC^b, Pinos H^a, Guzmán A^a, Collado P^a

^a Departamento de Psicobiología, Universidad Nacional de Educación

a Distancia. Madrid, España. ^b Centro Rita Levi Montalcini,

Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale,

Laboratorio di Neuroendocrinologia, Università di Torino. Torino, Italy

La amígdala medial es una estructura sexodimorfa perteneciente al sistema vomeronasal, el cual está implicado en la elicitación y mantenimiento de las conductas reproductoras en la rata. Estudios previos han puesto de manifiesto que una subdivisión de la amígdala medial, la parte anteroventral (MeAV), expresa actividad para el óxido nítrico de forma muy específica. Además, trabajos recientes han demostrado la implicación del óxido nítrico en la modulación de las conductas reproductoras. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar si la actividad de este neurotransmisor en MeAV puede estar modulada por el estradiol.

Para llevar a cabo nuestro estudio utilizamos 3 grupos experimentales: machos, hembras en estro y hembras en diestro. La actividad nitrérgica en MeAV fue analizada mediante histoquímica para la NADPH-diaforasa. Los resultados obtenidos demuestran que, en relación con la tinción de NADPH-d en MeAV, existen dos subpoblaciones neuronales, una de tinción intensa y otra de tinción media y que sólo una de las dos poblaciones, la más intensa, podría estar modulada por el estradiol, ya que las hembras en estro presentan un población significativamente mayor que los otros dos grupos estudiados.

Nuestros resultados muestran que durante el estro una subpoblación nitrérgica específica es activada en MeAV. Este hecho podría estar relacionado con los cambios fisiológicos y conductuales que se producen durante el estro, y confirmaría la participación de esta estructura vomeronasal en la reproducción.

Financiado por MCYT: BOS2000-0145.

P 92

EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON NOMIFENSINA AUMENTÓ LAS CONCENTRACIONES EXTRACELULARES DE DOPAMINA Y ACETILCOLINA, PERO NO DE GLUTAMATO Y GABA, EN EL ESTRIADO DE LA RATA DESPIERTA

Hernández LF, Segovia G, Mora F

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina,

Universidad Complutense de Madrid

Se estudiaron los efectos de la administración crónica de nomifensina, un bloqueante de la recaptura de dopamina, sobre las concentraciones extracelulares de acetilcolina, dopamina, glutamato y GABA en el estriado de la rata despierta. Se empleó la técnica de microdialisis intracerebral y HPLC para el análisis simultáneo de los diferentes neurotransmisores. Se utilizaron ratas Wistar macho a las que se les

inyectó intraperitonealmente nomifensina (10 mg/kg) durante 22 días, realizándose los experimentos de microdiálisis en los días 1, 8, 15 y 22 del tratamiento. La concentración de dopamina se incrementó significativamente tras la administración de nomifensina no habiendo diferencias entre los distintos días de tratamiento. La concentración de acetilcolina no registró cambios en los días 1 y 8 de tratamiento mientras que en los días 15 y 22 se produjo un incremento significativo. No hubo efectos significativos en las concentraciones de los aminoácidos glutamato y GABA. La administración de nomifensina incrementó significativamente la actividad motora de los animales, no encontrándose diferencias entre los distintos días de tratamiento. Por el contrario, la actividad motora basal aumentó significativamente a lo largo del estudio. Estos resultados sugieren que el tratamiento crónico con un bloqueante de la recaptura de dopamina provoca una sensibilización del sistema colinérgico a la estimulación por dopamina en el neoestriado de la rata despierta.

Financiación: DGINV-SAF2000-0112.

P 93

RITMOS CIRCADIANOS DE ACETILCOLINA EN LA CORTEZA PREFRONTAL: EFECTOS DE LA PERFUSIÓN INTRACEREBRAL DE MELATONINA

Márquez de Prado B, Mora F

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

El objetivo del presente estudio fue investigar el ritmo circadiano de las concentraciones extracelulares de acetilcolina en corteza prefrontal y su modulación por melatonina. Paralelo a estos experimentos se midió la actividad motora espontánea. Para ello se realizaron experimentos de microdiálisis durante un ciclo de 6 h oscuridad : 12 h luz : 6 h oscuridad en ratas macho Wistar despiertas. Las perfusiones se realizaron con LCR a un flujo de 1,25 μ L/min y se recogieron muestras cada 30 minutos. La acetilcolina se analizó mediante HPLC acoplada a detección electroquímica. Las concentraciones extracelulares de acetilcolina y la actividad motora mostraron un ritmo circadiano ($p < 0,01$, $n = 5$; $p < 0,05$, $n = 5$), siendo sus niveles más altos durante la oscuridad. La melatonina (200 y 500 μ M) se perfundió en la corteza prefrontal durante 18 horas a partir del comienzo del periodo de luz. La perfusión de melatonina 200 μ M no alteró el patrón circadiano de acetilcolina ni de actividad motora espontánea. La perfusión de melatonina 500 μ M alteró el ritmo circadiano de acetilcolina pero no el de actividad motora espontánea. Estos resultados sugieren que la melatonina modula el ritmo circadiano de acetilcolina en la corteza prefrontal.

Financiación: DGINV-SAF 2000-0112 y CM2000-08.5/0070.1/2000.

P 94

INFLUENCIA DEL SEGMENTO C-TERMINAL DE LA GRAN REGIÓN CITOPLÁSMICA DE LA SUBUNIDAD $\alpha 7$ EN LA EXPRESIÓN FUNCIONAL DE RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA

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

Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC

Una de las características estructurales de los canales iónicos activados por ligando es la existencia de una gran región citoplásmica entre los segmentos transmembranales M3 y M4, prácticamente diferente para cada subunidad. En el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) formado por subunidades $\alpha 7$ hemos observado que el extremo C-terminal (aminoácidos 426-432) adyacente a M4, es necesario para la expresión de nAChRs. Con el fin de analizar en mas detalle la influencia de este segmento, se realizaron mutaciones puntuales en la subunidad $\alpha 7$ de rata y los correspondientes cRNAs se inyectaron en ovocitos de *Xenopus laevis*. A continuación se determinó la expresión de nAChRs

funcionales por medio de fijación de (125I)- α -bungarotoxina y por las corrientes producidas al activar con acetilcolina.

Mientras que la doble mutación D429A/E430A apenas afectó a la expresión, la triple mutación R426A/C427A/Q428A provocó un incremento de ~3 veces en nAChRs funcionales. La mutación sencilla R426A tuvo parecido efecto potenciador. Por el contrario, la doble mutación S431A/E432A provocó la expresión de nAChRs no funcionales. A este efecto parecen contribuir ambos aminoácidos, ya que las mutaciones individuales no produjeron efectos tan acusados. Estos resultados sugieren que varios aminoácidos de la zona C-terminal del gran segmento citoplásmico influyen en la expresión de nAChRs de manera distinta y con mecanismos que actualmente se están investigando.

P 95

MEDIACIÓN POR CÉLULAS INTERSTICIALES DE LA NEUROTRANSMISIÓN NITRÉRGICA DEL MÚSCULO LISO URETRAL

González-Soriano J^a, Rodríguez-Veiga E^a, Cigüenza P^a, Costa G^b, Triguero D^b, García-Pascual A^b

^aDepartamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Universidad Complutense. ^bDepartamento de Fisiología (Fisiología Animal), Universidad Complutense. Madrid

El óxido nítrico (NO) actúa como neurotransmisor relajante del músculo liso uretral, a través de la activación de la guanilato ciclasa y el consecuente incremento de GMPc. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha analizado la localización celular de la acumulación de GMPc inducida tanto por NO endógeno como exógeno, en preparaciones de la uretra proximal de corderos hembras. La actividad contráctil de las preparaciones fué registrada mientras el tejido era activado por estimulación eléctrica transmural (EFS, 2 Hz durante 1 min) o por adición de un donante de NO (S-nitrosocisteína, 10 mM durante 2 min), en la presencia de inhibidores de fosfodiesterasas de GMPc. En el punto de máxima relajación las preparaciones fueron rapidamente fijadas y sometidas a un procedimiento estandar de inmunohistoquímica. Sorprendentemente, no se observó reactividad para GMPc en las células musculares lisas, pero sí en fibras nerviosas y sobre todo en células estrelladas similares a las células intersticiales de Cajal. Este patrón de reactividad fué especialmente claro en las preparaciones activadas por EFS. Las sometidas a S-nitrosocisteína muestran una positividad mas difusa que se extiende a las células musculares lisas. Estos resultados sugieren que el neurotransmisor nitrérgico actuaría por intermedio células intersticiales, las cuales inducirían la relajación muscular por mecanismos aún no conocidos.

Este trabajo ha sido financiado por MCYT (PM99-0053-C02-01 y PM99-0053-C02-02).

P 96

DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA RECEPTOR-EFECTOR DE LA SOMATOSTATINA EN CORTEZA FRONTOPARIETAL DE RATA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE UNA SOLA DOSIS DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE

Agudo-Llera D, Hervás-Aguilar A, Puebla-Jiménez L, Burgos-Ramos E, Boyano-Adán MC, Arilla-Ferreiro E

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá de Henares. Madrid

En pacientes con enfermedad de Alzheimer se ha descrito una alteración del sistema somatostatinérgico cerebral. Sin embargo, se desconoce si el péptido β -amiloide es capaz de alterar el sistema receptor-efector de la somatostatina (SRIF) a nivel cerebral. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar el efecto del péptido β -amiloide (25-35)

sobre el sistema receptor-efector de la SRIF en la corteza frontoparietal de la rata. La administración intracerebroventricular de una sola dosis del péptido β -amiloide (10 μ g) a ratas Wistar (200-250 g) macho disminuyó significativamente el número de receptores de SRIF (27,4 %) y aumentó la afinidad (32,2 %) de dichos receptores en corteza frontoparietal a los 14 días de su administración. El efecto inhibidor de la SRIF sobre la actividad adenilil ciclasa (AC) basal y estimulada por forskolina, fue menor (18,6 y 55,5 % menos, respectivamente) con respecto a los controles. El péptido β -amiloide no tuvo ningún efecto sobre los parámetros citados a los 7 días de su administración. El péptido β -amiloide no modificó los niveles de las subunidades $G\alpha 1$, $G\alpha 2$ y $G\alpha 3$ en membranas de corteza frontoparietal. Los presentes resultados demuestran que el péptido β -amiloide altera el sistema receptor-efector de la SRIF, hallazgo que implica a dicho péptido en la alteración del sistema somatostatínérgico descrita en la enfermedad de Alzheimer.

P 97

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MARCADORES DE LOS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICO Y GABÉRGICO EN CÉLULAS DE ISLOTES PANCREÁTICOS

Baglietto-Vargas D^a, López-Téllez JF^a, Moreno-González I^a, Márquez J^b, Aledo JC^b, Gutiérrez A^a

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

^b Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Universidad de Málaga

Glutamato y GABA, principales neurotransmisores de carácter excitador e inhibidor respectivamente dentro del SNC, son de gran importancia en la fisiología de los islotes pancreáticos. Existen numerosas discrepancias en la identificación fenotípica glutamatérgica o gabérgica de las células de los islotes. Nuestro estudio analiza la expresión de enzimas, transportadores y receptores implicados en la señalización mediada por glutamato y GABA en islotes pancreáticos de rata mediante técnicas inmunocitoquímicas e inmunotransferencias. Una intensa inmunotinción para KGA y LGA se localizó en células α mientras que la enzima GAD67 se concentró en células β , datos que son compatibles con la posible liberación de glutamato por células secretoras de glucagón y de GABA por células secretoras de insulina. Además, las células β expresan LGA, VGLUT1 y VGLUT2, indicando que estas células también podrían liberar glutamato como transmisor. En relación a los receptores, las células β expresan NMDAR1, mGluR5, mGluR8, mGluR1 α y GluR1 mientras que las células α expresan mGluR5 y mGluR8, lo que es consistente con la idea de que ambos tipos celulares son regulados por glutamato. Por otro lado, la subunidad $\alpha 1$ de los receptores GABA_A está presente en células β , formando parte de autorreceptores. Nuestro estudio apoya la idea de que ambos transmisores, glutamato y GABA, juegan papeles muy complejos en la función endocrina pancreática.

Subvencionado por CTS-0161 y SAF2001-1894.

P 98

ESTUDIO DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS DEL HIPOCAMPO EN RATAS ALCOHÓLICAS

Robles N^{a,b}, Ferré N^b, Sabrià J^a

Institut de Neurociències. ^a Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica, UAB. ^b Departament de Psicobiologia i Metodologia en CCSS, Unitat de Psicobiologia, UAB

El etanol modula positivamente el receptor nicotínico. En estudios realizados *in vitro* a concentraciones comparables a las alcanzadas en sangre por intoxicación alcohólica, se produce el desplazamiento y estabilización del receptor en la conformación activa afin al agonista. Por otra parte ha sido descrita la regulación paradójica al

alza del receptor nicotínico ante la presencia continuada del agonista. El etanol pudiera producir, tras consumo crónico, un tipo de adaptación farmacodinámica similar. Se ha verificado en ratas alcohólicas una sensibilización para la nicotina intrahipocámpal. En el presente trabajo, se ha estudiado el efecto del consumo crónico y voluntario de etanol en ratas Wistar no seleccionadas, criadas según el modelo APP (alcoholismo primario precoz), alcanzándose niveles tóxicos de etanol en sangre ($1,051 \pm 0,114$ g/L), sobre el *binding* de receptores nicotínicos del hipocampo. Se obtuvo una preparación de membranas de los hipocámpos, que se incubó con seis concentraciones de [³H]Nicotina y se determinó la K_d y la B_{max}. Los resultados mostraron un aumento ($p = 0,0006$) de la B_{max} ($50,12 \pm 4,98$ fM/mg proteína, grupo control; $84,78 \pm 13,17$ fM/mg proteína, grupo APP) y un aumento ($p = 0,02$) de la K_d ($6,62 \pm 1,87$ nM, grupo control; $13,00 \pm 4,54$ nM, grupo APP). En conclusión, el consumo crónico de etanol ha producido, en los receptores nicotínicos del hipocampo, un aumento de la densidad y una disminución de la afinidad por el radioligando utilizado.

P 99

EFFECTO DE 8-OH-DPAT, AGONISTA 5-HT1A, SOBRE CAMBIOS EN LA FUNCIONALIDAD DE RECEPTORES NMDA Y AMPA ASOCIADOS A PROCESOS DE APRENDIZAJE

Schiapparelli L, Moyano S, Salazar P, Frechilla D, Del Río J

Departamento de Farmacología, Universidad de Navarra. Pamplona

La acción de la serotonina en procesos cognitivos puede atribuirse a un efecto modulador sobre otros sistemas de neurotransmisión, en particular el glutamatérgico. En este trabajo se ha analizado si el deterioro en la adquisición de un aprendizaje evitación pasiva en rata inducido por activación de receptores 5-HT1A se relaciona con cambios en la expresión y funcionalidad de subunidades de receptores NMDA y AMPA, en particular NR1 y GluR1.

Se ha encontrado que 1h después de la inducción del aprendizaje se produce un aumento de los niveles de la subunidad NR1 y de pNR1-Ser97 en membranas de hipocampo. Este efecto es prevenido por 8-OH-DPAT que provoca un claro déficit cognitivo en este test. A este tiempo no se detectaron modificaciones en los niveles de la subunidad GluR1. Dado que los cambios en receptores AMPA se ponen de manifiesto en etapas más tardías, se estudió su expresión 3h después de la adquisición del aprendizaje. A este tiempo se encontró un aumento significativo de la fosforilación de GluR1 en Ser845 y Ser831 en hipocampo. Estos cambios no se observaron en animales pretratados con 8-OH-DPAT. Los efectos de este agonista sobre los cambios asociados al aprendizaje fueron revertidos por el antagonista 5-HT1A selectivo WAY-100635. La activación de receptores 5-HT1A incide directamente por tanto sobre el aumento secuencial de la funcionalidad de receptores NMDA y AMPA asociado al proceso de adquisición/consolidación de la memoria.

Financiado por MCyT, BFI2001-1602.

P 100**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS SUBUNIDADES $\alpha 1$ Y $\alpha 5$ DE LOS RECEPTORES GABA_A EN EL HIPOCAMPO DURANTE EL DESARROLLO POSNATAL DE RATA**López-Téllez JF^a, Vela J^b, Ramos B^b, Del Río JC^b, Baglietto-Vargas D^a, Ruano D^b, Vitorica J^b, Gutiérrez A^a^aDepartamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga. ^bDepartamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Universidad de Sevilla

El ácido γ -amino-butírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio del SNC adulto, ejerce una acción excitadora en estadios postnatales tempranos. Cambios en la composición de subunidades de los receptores GABA_A pueden contribuir a estas diferencias funcionales. En el presente trabajo analizamos los patrones de expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 5$ en el hipocampo de rata desde el nacimiento (P0) hasta la edad adulta (P90) mediante RT-PCR, *Western blot* e inmunocitoquímica. Los niveles de mRNA y proteína para $\alpha 1$ fueron muy bajos en la primera semana posnatal mostrando un incremento progresivo hasta la edad adulta, sin embargo $\alpha 5$ mostró un patrón de expresión opuesto siendo los niveles más altos en la primera semana posnatal. Por otro lado, la inmunorreactividad para $\alpha 1$ fue débil en los primeros días posnatales, aumentando de forma progresiva hasta P15 donde se alcanza el patrón típico de adulto en estratos dendríticos e interneuronas. Sin embargo, la inmunorreactividad para $\alpha 5$ durante la primera semana posnatal se concentró en los somas de las neuronas piramidales de CA1-CA3 y de células granulares del giro dentado. A partir de P15 y hasta el adulto, la inmunotinción de $\alpha 5$ se concentró en los campos dendríticos de CA1-CA3 y giro dentado. Por lo tanto, estos cambios en la expresión de $\alpha 1$ y $\alpha 5$ pueden estar implicados en las diferentes propiedades funcionales de los receptores GABA_A en neuronas hipocámpicas neonatales y adultas. Subvencionado por CTS-0161 y FIS 00/0314.

P 101**COEXPRESIÓN E INTERACCIÓN FUNCIONAL DE RECEPTORES 5-HT1A Y 5-HT2A EN NEURONAS PIRAMIDALES CORTICALES. 3. MODULACIÓN DEL CIRCUITO CORTEZA PREFRONTAL-NÚCLEOS DEL RAJE**Artigas F, Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Adell A
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC (IDIBAPS)

Alrededor de un 60 % de las neuronas de la corteza prefrontal medial (CPFm) coexpresan los receptores 5-HT1A y 5-HT2A. Esta área contiene abundantes neuronas piramidales que proyectan a estructuras subcorticales como el área tegmental ventral y los núcleos del rafe, origen de las vías dopaminérgica y serotoninérgica ascendentes. Estudios previos indican que la estimulación de receptores 5-HT2A en CPFm aumenta la frecuencia de descarga de las neuronas piramidales que proyectan al rafe, activando de este modo su descarga y la liberación terminal de 5-HT. En este trabajo hemos estudiado la interacción entre los receptores 5-HT1A y 5-HT2A en CPFm usando la liberación *in vivo* de 5-HT como un indicador de la actividad de las vías piramidales descendentes. La aplicación de agonistas 5-HT1A (BAY x 3702, 8-OH-DPAT y azapironas) revirtió el aumento de liberación de 5-HT producido por DOI al estimular los receptores 5-HT2A de CPFm. El efecto de BAY x 3702 se redujo con el antagonista 5-HT1A WAY-100635 y mediante la inactivación de los receptores 5-HT1A con toxina pertussis y EEDQ. Asimismo, la aplicación de BAY x 3702 y 8-OH-DPAT en CPFm de ratón a) redujo la liberación local de 5-HT; y b) revirtió el aumento inducido por DOI en ratones C57/BL6 control pero no en ratones mutantes nulos (KO 5-HT1A). Así pues, la activación de receptores 5-HT1A y 5-HT2A induce efectos opuestos sobre la actividad de las vías piramidales de CPFm que proyectan a las neuronas serotoninérgicas del rafe.

P 102**COEXPRESIÓN E INTERACCIÓN FUNCIONAL DE RECEPTORES 5-HT1A Y 5-HT2A EN NEURONAS PIRAMIDALES CORTICALES. 2. INTERACCIÓN A NIVEL CELULAR**

Puig MV, Celada P, Artigas F

Departamento de Neuroquímica, IIBB-CSIC-IDIBAPS

El 60 % de las neuronas de la corteza prefrontal de roedor expresa receptores 5-HT1A o 5-HT2A, estando coexpresados en un 80% de dichas neuronas. En el presente trabajo hemos estudiado las respuestas inducidas en neuronas piramidales de corteza prefrontal medial (CPFm) por la estimulación eléctrica de los núcleos dorsal y medial del rafe, que contienen las neuronas serotoninérgicas que proyectan a CPFm. La estimulación de ambos núcleos produjo dos tipos de respuestas: excitaciones e inhibiciones. Las excitaciones tienen una latencia media de 71 ± 8 ms, una duración de 101 ± 8 ms y están mediadas en su mayor parte por el receptor 5-HT2A, ya que se revirtieron (10/12) con el antagonista selectivo M100907 (0,2-0,6 mg/kg IV). Las inhibiciones tienen una latencia media de 87 ± 19 ms y una duración de 15 ± 37 ms y están mediadas en su mayor parte por el receptor 5-HT1A ya que se revirtieron (8/10) con el antagonista selectivo WAY-100635 (10-60 μ g/kg IV). La estimulación secuencial de zonas distintas de los núcleos del rafe produjo respuestas opuestas (inhibitorias a excitatorias o viceversa) en la misma neurona piramidal. En algunos casos, la estimulación del rafe indujo una respuesta inhibitoria cuya reversión mediante WAY-100635 desenmascaró una excitación que se revirtió con el antagonista 5-HT2A M100907. Estos datos muestran que la coexpresión de receptores 5-HT1A y 5-HT2A en neuronas piramidales se acompaña de respuestas de carácter opuesto en las neuronas piramidales de CPFm.

P 103**MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CORTEZA PREFRONTAL POR LOS RECEPTORES 5-HT2A. RELACIÓN CON AFERENCIAS TALAMOCORTICALES**Díaz-Mataix L, Puig MV, Celada P, Artigas F
Departamento de Neuroquímica, IIBB-CSIC-IDIBAPS

La serotonina (5-HT) aumenta los EPSCs en neuronas piramidales de corteza prefrontal medial (CPFm) por activación de receptores 5-HT2A supuestamente localizados en terminales talamocorticales (Aghajanian y Marek, 1999). Estudios previos indican que la estimulación de receptores 5-HT2A en CPFm por el alucinógeno DOI aumenta la frecuencia de descarga de las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal (RD) y la liberación prefrontal de 5-HT. En el presente estudio hemos analizado el efecto de DOI sobre la frecuencia de descarga de neuronas piramidales de CPFm *in vivo* y su relación con las aferencias excitatorias de los núcleos mediodorsal y centromedial del tálamo, que inervan la CPFm. La administración IV de DOI aumentó la descarga (481%) en 21/56 neuronas, inhibiendo (11%) 17/56 neuronas, sin afectar al resto (19/56) (aumento global de 2.4 veces). Los efectos del DOI, así como las excitaciones piramidales inducidas por estimulación eléctrica del RD se bloquearon con M100907 (antagonista 5-HT2A). Al igual que el DOI, la desinhibición talámica mediante bicuculina aumentó la descarga de las neuronas piramidales y la liberación de 5-HT en CPFm. Sin embargo, la estimulación de receptores μ -opioides y mGlu II de la CPFm revirtió los efectos de la desinhibición talámica pero no los de DOI. Finalmente, estos últimos no se alteraron tras lesiones del tálamo, lo que indica que DOI actúa sobre receptores 5-HT2A piramidales y no sobre los localizados en terminales axónicas.

P 104

COEXPRESIÓN E INTERACCIÓN FUNCIONAL DE RECEPTORES 5-HT1A Y 5-HT2A EN NEURONAS PIRAMIDALES CORTICALES.

1. ESTUDIOS DE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F

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

La corteza prefrontal (CPF) juega un papel clave en diversas funciones cerebrales superiores. De entre los neurotransmisores presentes en CPF, se conocen con cierto detalle las acciones de la dopamina. Sin embargo, el papel de la serotonina es mucho menos conocido, a pesar de que la CPF está densamente innervada por axones serotoninérgicos y posee gran densidad de receptores 5-HT. En el presente trabajo hemos estudiado la expresión de receptores 5-HT1A y 5-HT2A en la CPF de rata y ratón mediante doble hibridación *in situ*, usando sondas marcadas con digoxigenina-11-dUTP (5-HT1A) y [33P]a-dATP (5-HT2A). El porcentaje de células que expresan uno u otro receptor es aproximadamente un 60 % en ambas especies, con un nivel de coexpresión de alrededor de un 80%. El mayor porcentaje de coexpresión en rata se da en ténia tecta y corteza piriforme (88 y 90%). El nivel de coexpresión es asimismo muy alto en el área motora (Fr2), corteza infralímbica y prelímbica (83, 82 y 79%, respectivamente), mientras que es mucho menor en capas profundas (38%) donde predomina el receptor 5-HT1A. En ratón, el nivel de coexpresión es parecido, oscilando entre un 73 y un 82% en corteza infralímbica y piriforme, respectivamente, y un 48% en capas profundas. Dado el bajo porcentaje de receptores 5-HT1A y 5-HT2A en interneuronas gabaérgicas (Santana et al., SENC 2003), los datos del presente estudio indican que un elevado porcentaje de neuronas piramidales de CPF expresan ambos tipos de receptores.

P 105

LA FIJACIÓN DEL LIGANDO CANNABINOIDE [3H]CP55-940 NO ESTÁ ALTERADA EN GLIOBLASTOMAS HUMANOS

Hostalot C^{a,b}, Callado LF^b, Garibi JM^{a,c}, Meana JJ^b

^aServicio de Neurocirugía, Hospital de Cruces. Bizkaia. ^bDepartamento de Farmacología, UPV/EHU. ^cDepartamento de Cirugía, UPV/EHU

Los tumores gliales son la neoplasia cerebral más común en humanos. Se ha demostrado que diferentes compuestos cannabinoides inducen apoptosis en células tumorales de origen glial.

El objetivo del estudio fue valorar la fijación del radioligando cannabinoide [3H]CP55-940 en membranas de glioblastomas humanos y en tejido cerebral normal. Los glioblastomas (n=8) se obtuvieron en el trascurso de intervenciones neuroquirúrgicas. Los fragmentos de cerebro humano control (n=8) procedieron de autopsias judiciales. Una vez extraídas, las muestras se congelaron a -80°C hasta el ensayo. Se realizaron experimentos de saturación con [3H]CP55-940 (0,01-8 nM, 11 concentraciones) en alícuotas de membranas (fracción P2). La fijación no específica se determinó en presencia de WIN55,212-2 (10-6 M). Los parámetros farmacológicos de la fijación de [3H]CP 55-940 fueron similares en glioblastomas y cerebro humano normal, no observándose diferencias estadísticamente significativas ni en la afinidad del radioligando ($K_d = 0,98 \pm 0,37$ nM y $1,7 \pm 0,48$ nM, respectivamente) ni en la densidad máxima de lugares de fijación del mismo ($B_{max} = 1.750 \pm 411$ fM/mg proteína y 1.416 ± 291 fM/mg proteína, respectivamente). Los presentes resultados parecen descartar la existencia de alteraciones en la densidad de receptores identificados mediante la fijación del radioligando cannabinoide [3H]CP 55-940 en glioblastomas humanos. Financiado por MCYT (SAF 02/10370E).

P 106

ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA GABÉRGICO EN EL SACO VASCULOSO CULTIVADO *IN VITRO*

Ferreiro S, Sueiro C, Anadón R, Lamas J, Rodríguez-Moldes I

Departamento de Biología Celular y Ecología, Univ. de Santiago

El saco vascular (SV) es un neuroepitelio del hipotálamo caudal de peces que contiene células gliales de soporte, neuronas gabaérgicas y un tipo glial característico y exclusivo, las células coronadas. Se conocen bien su estructura y conexiones, pero no su función. Como parte de un estudio morfofuncional, hemos desarrollado el cultivo *in vitro* del SV para analizar sus posibles efectos sobre las células coronadas y el sistema gabaérgico. Para ello, SVs enteros obtenidos de truchas adultas (*Oncorhynchus mykiss*) se mantuvieron en medio L-15 de Leibovith, conteniendo 2% de suero fetal bovino y antibióticos, durante 2 a 8 días y a 19°C. Fragmentos del SV fueron procesados inmunohistoquímicamente con anticuerpos contra GAD, o fijados con glutaraldehído/formaldehído y tetróxido de osmio, e incluidos en resina para obtener secciones semifinas. Nuestros resultados revelan que la organización característica del SV (Yáñez et al. Cell Tissue Res 1997; 288: 497) se mantiene bastante bien tras 8 días de cultivo *in vitro* en amplias zonas, que presentan la misma organización tisular que los controles. El estudio de secciones semifinas ha revelado también que los glóbulos (cilios dilatados) de las células coronadas se hinchan primero, para exfoliarse y regenerarse en días sucesivos. En las regiones más internas del SV se han observado importantes alteraciones morfológicas, posiblemente debidas a su menor accesibilidad al medio de cultivo. Estos resultados indican que el cultivo del SV puede ser útil para poder testar las diferentes hipótesis enunciadas sobre las funciones de las células coronadas.

Financiado por la Xunta de Galicia (PGIDT01PXI20007PR).

P 108

LA ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES D2 EN LA CORTEZA PREFRONTAL REDUCE LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE DOPAMINA Y ACETILCOLINA, PERO NO DE GLUTAMATO Y GABA, EN EL NÚCLEO ACCUMBENS DE LA RATA DESPIERTA

Del Arco A^{a,b}, Fuxe K^b, Mora F^a

^aDepartamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. ^bDepartment of Neuroscience, Karolinska Institute, Estocolmo, Suecia

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la estimulación de receptores D2 dopaminérgicos en corteza prefrontal (CP) sobre las concentraciones extracelulares de dopamina (DA), acetilcolina (ACh), glutamato (Glu) y GABA en núcleo accumbens (NA). En ratas Sprague-Dawley macho se implantaron estereotáxicamente cánulas guía para microinyecciones bilaterales en CP y microdialisis en NA. Las inyecciones del agonista D2 quinpirole (Quin; 5 µg/0,5 µL/sitio) se realizaron a un flujo de 0,4 µL/min. Las cánulas de microdialisis (2 mm membrana) se perfundieron con LCRs, conteniendo neostigmina 1 µM, a un flujo de 2 µL/min. El contenido de DA, ACh, Glu y GABA en las muestras se analizó mediante HPLC acoplado a detección electroquímica y fluorométrica. Las concentraciones basales en NA fueron 1,1 nM (DA), 19 nM (ACh), 0,8 µM (Glu) y 0,12 µM (GABA) (n=4-5). La inyección bilateral de Quin en CP redujo la actividad motora espontánea y las concentraciones extracelulares de DA (40%; n=5, p<0,05) y de ACh (30%; n=5, p<0,05) en NA. La inyección de Quin también redujo las concentraciones extracelulares de los metabolitos de DA, DOPAC Y HVA. No se modificaron las concentraciones extracelulares de Glu o GABA en NA (n=4). Estos resultados sugieren que los receptores D2 en CP regulan la neurotransmisión dopaminérgica y acetilcolinérgica en NA. Estos resultados son relevantes para entender las alteraciones neuroquímicas y conductuales que ocurren en la esquizofrenia. Financiación: DGINV-SAF2000-0112.

P 109**CALBINDINA Y PARVALBÚMINA EN NEURONAS DEL TÁLAMO DE MACACOS QUE CONTIENEN EL RECEPTOR DE DOPAMINA D1**

Rodríguez-Moral M, Cavada C

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

Recientemente hemos demostrado que D1 se localiza selectivamente en neuronas de proyección del tálamo de macacos. Se ha propuesto que las neuronas de proyección talámicas constituyen sistemas funcionales diferentes según su expresión de las proteínas ligadoras de calcio calbindina (Cb) o parvalbúmina (Pv), que correlaciona con el patrón laminar de conexiones corticales (Jones EG, 2001). Para explorar si las neuronas talámicas que expresan D1 pertenecen a uno u otro sistema, o a ambos, hemos realizado inmunohistoquímica doble para D1 y para Cb o Pv en monos *Macaca nemestrina* adultos.

Existen marcadas diferencias en la expresión de D1 y las proteínas ligadoras de calcio entre los núcleos de relevo sensorial y el complejo CnMd-Pf, y el resto de núcleos (relevo motor y asociativos). En los primeros apenas hay neuronas doblemente marcadas para D1 y Cb, que son las más abundantes en los núcleos motores y asociativos. En cambio, hay numerosas neuronas doblemente marcadas para D1 y Pv en los núcleos de relevo sensorial y CnMd-Pf; tales neuronas son muy escasas en el resto de núcleos.

Estos resultados sugieren que en los sistemas de relevo sensorial las neuronas talámicas que expresan D1 proyectan a capas intermedias de la corteza cerebral (donde proyectan las neuronas que expresan Pv) y están involucradas en la transmisión sensorial específica. El resto de núcleos talámicos exige un estudio del patrón de proyección cortical de las neuronas que expresan D1 y Cb.

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

P 110**LOS RECEPTORES DE DOPAMINA D4 Y μ OPIOIDES INTERACCIONAN EN EL ESTRIADO DE RATA**Gago B^a, Rivera A^a, Peñafiel A^a, Valderrama JJ^a, Martos F^b, De la Calle A^a^aDepartamento de Biología Celular, Universidad de Málaga.^bDepartamento de Farmacología, Universidad de Málaga

Los sistemas dopaminérgico y opioide interaccionan en el estriado modulando la actividad locomotora y el comportamiento emocional-motivacional. La dopamina de la vía mesolímbica está asociada a los efectos de recompensa de la dependencia a opioides, mientras que en la vía nigroestriatal interviene en la producción de movimientos estereotipados inducidos por opioides.

En trabajos previos hemos demostrado que el receptor D4 se expresa en parches en el estriado, al igual que los receptores μ opioides. Este solapamiento en la distribución sugiere que ambos receptores pueden interaccionar en los estriosomes. En el presente trabajo hemos estudiado en primer lugar, y en experimentos de saturación, si la estimulación de los receptores D4 con el agonista específico PD 168,077, modifica la unión del ligando opioide [³H] DAMGO. En segundo lugar, se han estudiado cambios en la expresión de los receptores μ opioides inducidos por los receptores D4 mediante técnicas inmunocitoquímicas y valorados por densitometría. Estos cambios se han analizado en tratamientos agudos a distintos tiempos (2-24h) y en tratamiento crónico (7 días), en las diferentes regiones del estriado (rostral, medial y caudal; dorsal, ventral, medial y lateral). Los resultados obtenidos sugieren que los receptores D4 y μ opioides interaccionan en el estriado y que dicha interacción debe desempeñar un papel crucial en los fenómenos de adicción y recompensa de los opioides.

Financiado por MCYT (BFI2002-00587) y JA (CTS-0161).

P 111**EVIDENCIAS DE UN CONTROL DOPAMINÉRGICO DEL ÓRGANO SUBCOMISURAL DE MAMÍFEROS**Tomé M^a, Jiménez AJ^a, Bermúdez-Silva FJ^b, Moreira E^a, Pérez-Fígares JM^a^aDepartamento de Biología Celular, Genética y Fisiología,^bFundación Hospital Carlos Haya. Málaga

El órgano subcomisural (OSC) de mamíferos es una glándula endodermica que secreta glucoproteínas al líquido cefalorraquídeo. La función del OSC no está clara y su alteración se ha relacionado con la hidrocefalia. Está innervado por varios neurotransmisores y neuropéptidos, siendo la innervación serotoninérgica la más conocida. Además, algunos estudios han mostrado la presencia de fibras con tirosina hidroxilasa (TH) sobre el OSC de rata y vaca, sugiriendo que la dopamina y la noradrenalina pueden estar implicados en su control. Nuestro estudio muestra, por primera vez, la presencia de receptores de dopamina en el OSC de rata, ratón y vaca. Se realizó un estudio inmunohistoquímico y de *Western blot* con varios anticuerpos específicos para cada uno de los receptores de dopamina D2, D3, D4 y D5. La inmunohistoquímica reveló la presencia de estos receptores en el OSC de rata, ratón y vaca. Además, el análisis de inmunoblots mostró un patrón de bandas para D2, D3, D4 y D5 en el OSC bovino similar al de regiones control utilizadas (corteza y estriado). Cuando se cultivaron explantes de OSC de vaca en ausencia y en presencia de dopamina, se observaron variaciones en la expresión de estos receptores. Además, estudios preliminares mediante ELISA de los medios de cultivo condicionados por explantes, parecen indicar una acción inhibitoria de la dopamina sobre la secreción del OSC.

Financiado por DGICYT BFI 2000-1360; FIS 01/0948 y Red Cien, Instituto de Salud Carlos III.

P 112**EXPRESIÓN GÉNICA EN LA CORTEZA PREFRONTAL HUMANA**

De Almeida J, Mengod G

*Dept. Neuroquímica, Instituto de Investigaciones**Biomédicas de Barcelona, CSIC-IDIBAPS*

La corteza prefrontal participa en muchas funciones cerebrales superiores tales como memoria, inhibición del comportamiento, afecto. La función y el metabolismo de la corteza prefrontal se encuentran alterados en pacientes con trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia y la depresión. Hemos iniciado una serie de estudios para analizar la expresión del ARNm de una serie de genes, directa o indirectamente implicados en la esquizofrenia, mediante hibridación *in situ* con oligonucleótidos marcados con ³³P -dATP, y con digoxigenina, en la corteza prefrontal de cerebros humanos control obtenidos postmortem. Las células glutamatérgicas que contienen el mRNA del transportador vGLUT1 son las más abundantes en prácticamente todas las capas celulares de la corteza humana. Mientras que las que contienen el mRNA de vGLUT2 predominan en núcleos del tálamo siendo su presencia mucho más débil en las capas corticales. Presentaremos los resultados obtenidos por hibridación *in situ* doble, combinando en una misma sección dos sondas complementarias para distintos ARNm. Determinaremos el porcentaje de células glutamatérgicas que expresan los ARNm para receptores de neurotransmisores tales como los de la serotonina 5-HT1A, 5-HT2A, y de algunos de los receptores de la dopamina.

Proyecto financiado por la Fundación La Marató de TV3 (#013930).

P 113

LOS CANNABINOIDES ESTIMULAN LA SÍNTESIS DE NORADRENALINA EN EL CEREBRO DE RATA *IN VIVO* A TRAVÉS DE RECEPTORES CB1

Esteban S, Moranta D, García-Sevilla JA

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

Se han caracterizado dos subtipos de receptores para cannabinoides (CB), el CB1 y el CB2 localizados preferentemente en cerebro y sistema inmune, respectivamente. El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) es el principal constituyente psicoactivo del cannabis y presenta una afinidad similar por ambos receptores. Estudios previos han puesto de manifiesto un efecto estimulador del THC sobre la síntesis de noradrenalina (NA) en diversas regiones cerebrales *in vivo*. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto agudo del THC sobre la síntesis de NA tras el tratamiento con antagonistas selectivos del receptor CB1, AM281 y SR141716A en el cerebro de rata *in vivo*. Se utilizó la acumulación de dopa tras inhibición de la descarboxilasa con NSD1015 (100 mg/kg, IP) como medida de la síntesis de dopa/NA *in vivo*. La dopa fue cuantificada mediante HPLC con detección electroquímica. El THC (10 mg/kg, IP, 1 h) incrementó la síntesis de dopa/NA en corteza ($57 \pm 6\%$, $n=8$, $p<0,05$) e hipocampo ($75 \pm 16\%$, $n=8$, $p<0,01$, ANOVA-Scheffé). No se observó ningún efecto por parte del AM281 (10 mg/kg, IP, 1 h) ni del SR141716A (10 mg/kg, IP, 1 h) sobre la síntesis de dopa/NA; sin embargo, ambos antagonizaron el efecto estimulador inducido por el THC. Los resultados indican que el efecto estimulador de los cannabinoides sobre la síntesis de NA está mediado por el receptor CB1.

Trabajo financiado por el MCYT BFI2000-0306. D.M. es becario FPI (MCYT). El SR141716A fue cedido por Sanofi-Synthelabo.

P 114

DENSITOMETRÍA Y MORFOMETRÍA DEL COLÍCULO INFERIOR DE LA RATA: ESTUDIO CON GABA Y GLICINA EN SECCIONES SEMIFINAS

Merchán M^a, Aguilar L^{a,b}, López-Poveda EA^a, Malmierca MS^a

^aInstituto de Neurociencias de Castilla y León,

Universidad de Salamanca. ^bFundación Carolina

Para entender el modo de procesamiento de señales del colículo inferior (CI) es importante determinar las características de los tipos neuronales excitadores e inhibidores. En este estudio se trata de conocer la diversidad neuronal del CI combinando tres parámetros: el neurotransmisor que utilizan, la morfología del soma y el número de aposiciones inmunorreactivas para GABA y glicina que reciben. Se realizaron secciones seriadas de 1 μ m. del CI de cuatro ratas Wistar previamente incluidos en Durcupan. Tras desplastificar, se inmunotifieron las secciones de forma alternativa con anticuerpos para GABA y glicina (cedidos por el Dr. Ottersen). Realizamos un análisis densitométrico de la inmunorreactividad para GABA, tamaño y número de aposiciones inmunotendidas. Aplicando un estadístico multiparamétrico para caracterizar poblaciones neuronales del CI encontramos los siguientes resultados: existen dos tipos de población de neuronas inmunorreactivas para GABA, diferenciadas densito-métricamente. El tipo más abundante de neuronas del CI es GABA y glicina inmunonegativo (neuronas potencialmente excitatorias). En el CI, aproximadamente 1/4 de la población neuronal es GABA positivas. El conjunto de neuronas del CI muestran una mayor proporción de aposiciones GABA inmunorreactivas que de glicina inmunorreactivas (4:1). Se discute la posible existencia de otros tipos o subtipos de neuronas en relación al número de aposiciones GABA o glicina inmunorreactivas que reciben.

Estudio financiado por: MCYT (proy. DGEs Nro. BFI2000-1396), JCyL (proy. SA084/01), Fundación Carolina.

P 115

NEUROTRANSMISIÓN INTRASEPTAL: EFECTO DEL β -AMILOIDE (25-35)

Santos JT, De la Fuente A, Criado JM, Riobos AS, Heredia M, Ashenafi S, Navarro JD, Yajeya JP

Departamento de Fisiología y Farmacología, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca. Salamanca

Las neuronas que conforman el septum medial regulan la función hipocampal a través de sus proyecciones colinérgicas y gabaérgicas. Esta estructura se encuentra muy deteriorada en enfermos con demencias tipo Alzheimer debido a la especial sensibilidad de las neuronas colinérgicas al péptido β -amiloide. A fin de caracterizar esta interacción, se ha estudiado en rodajas septales el efecto del péptido β -amiloide 25-35 sobre los potenciales de acción y la neurotransmisión intraseptal utilizando la técnica de *current clamp* o *whole cell patch* perforado con gramicidina. Las neuronas septales se han caracterizado por su tipo de respuesta a pulsos despolarizantes en: a) *bursts* (18%), b) respuesta múltiple (60%), y c) respuesta única (22%). El estímulo de la banda diagonal generó en el 80% de las neuronas una corriente excitatoria (EPSC, 40 ± 5 pA) mediada por ácido glutámico. La perfusión con β -amiloide 25-35 (2 μ M) no afectó el potencial de acción registrado, sin embargo, generó una depresión de la respuesta (25 ± 5 pA) en el 70% de los casos ($n=35$). La preincubación con atropina (5 μ M) bloqueó el efecto del β -amiloide sobre la respuesta evocada. Estos resultados sugieren: 1) el péptido β -amiloide no afecta los canales voltaje dependientes; 2) sus efectos se ejercen a nivel de la transmisión sináptica; y 3) los receptores muscarínicos pueden estar implicados en el mecanismo patogénico de este péptido.

Financiado por BFI2000-1190.

P 116

PREACOPLE DE ADRENOCEPTORES ALFA-2A A PROTEÍNAS G EN CORTEZA CEREBRAL POST-MORTEM DE SUICIDAS CON DEPRESIÓN MAYOR

Rivero G^a, Gabilondo AM^a, Meana JJ^a, García-Sevilla JA^b

^aDepartamento de Farmacología, Universidad País Vasco. ^bClinical Research Unit, Department of Psychiatry, Universidad de Ginebra, H.U.G., Suiza

En sujetos con depresión mayor, se han descrito aumentos en la densidad del adrenoceptor alfa-2A cuando se cuantifican con radioligandos agonistas e incrementos en su funcionalidad (estímulo de la fijación de [³²S]GTP γ S). Esto puede reflejar aumentos en el número total de receptores o bien en su capacidad de acople a proteínas G.

El objetivo de este trabajo ha sido comparar el preacople (en ausencia de agonista) del adrenoceptor alfa-2A en suicidas con depresión mayor frente a sujetos control.

Se estudió el aumento de la fijación específica del radioligando agonista inverso [³H]-RX821002 (2 nM) tras el desacople inducido por Gpp(NH)p (100 μ M), EDTA (1 mM) y Na⁺ (140 mM) en membranas de corteza cerebral *post-mortem* de suicidas con depresión mayor ($n=18$) y de individuos control ($n=18$).

La fijación basal del [³H]-RX821002 fue ligeramente mayor en suicidas (133 ± 10 fM/mg proteína) que en controles (119 ± 13 fM/mg proteína). Sin embargo, el aumento en la fijación del [³H]-RX821002 inducido por la adición de Gpp(NH)p/EDTA/Na⁺ fue similar en suicidas ($14\% \pm 5$) y controles ($15\% \pm 4$).

Estos resultados sugieren que los incrementos en la densidad de adrenoceptores alfa-2A descritos en sujetos con depresión mayor mediante fármacos agonistas se relacionarían más con un aumento neto en el número de receptores que con su capacidad de preacople a proteínas G.

Financiado por FIS (01/0358) y UPV/EHU (00026.125-13588/2001).

P 117**LOCALIZACIÓN DEL mRNA DEL RECEPTOR 5-HT₄ DE SEROTONINA EN SUBPOBLACIONES NEURONALES DEL CEREBRO DE RATA**

Vilaró MT, Peñas R, Mengod G

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

Los receptores 5-HT₄ de serotonina en cerebro modulan la liberación de neurotransmisores y están implicados en procesos de aprendizaje y memoria. Existen densidades altas de receptores 5-HT₄ en los ganglios basales: accumbens, caudado-putamen, globo pálido, sustancia negra. En cambio su mRNA es muy abundante en *accumbens* y caudado-putamen pero no en globo pálido y sustancia negra. En este estudio se determinó, mediante doble hibridación *in situ*, la localización celular del mRNA del receptor 5-HT₄ en subpoblaciones neuronales de los ganglios basales de rata. El mRNA del neuropéptido encefalina se usó como marcador de neuronas estriatopálidas. A niveles caudales del caudado-putamen la mayoría de neuronas encefalinérgicas expresan mRNA del receptor 5-HT₄. A niveles más frontales el grado de colocación es menor. El mRNA de los neuropéptidos sustancia P y dinorfina permitió identificar neuronas estriatonigrales, que en su mayoría no expresan mRNA del receptor 5-HT₄. Las interneuronas estriatales colinérgicas y las que contienen parvalbumina no expresan mRNA del receptor 5-HT₄. Dicho mRNA no se detecta en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta pero sí en células no dopaminérgicas de la *pars reticulata*. Así, en rata, los receptores 5-HT₄ se expresan abundantemente en la proyección estriatopalidal. Su expresión es menor en la proyección estriatonigral y nula en la vía dopaminérgica nigroestriatal.

Financiado por MCyT: programa Ramón y Cajal; SAF2002-03408.

P 118**REGULACIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO POR ÓXIDO NÍTRICO EN NEUROBLASTOS**

Murillo-Carretero M, Ruano MJ, Villalobo A, Estrada C

Area de Fisiología, Universidad de Cadiz

El óxido nítrico (NO) es antiproliferativo en diversos tipos de células. En varias líneas celulares que sobreexpresan el receptor de EGF (EGFR), el NO inhibe la actividad tirosina kinasa de este receptor. Hemos empleado la línea de neuroblastoma humano NB69, que de forma natural expresa el EGFR, para estudiar el mecanismo de dicha inhibición. En estas células, los donantes de NO, SNAP, DEA-NO y DETA-NO, inhibieron la división celular de forma dependiente de la concentración, por un mecanismo que no implicaba formación de cGMP. La estimulación de la proliferación celular con EGF aumentó significativamente la sensibilidad al efecto antimitótico del NO. La adición de DEA-NO inhibió la transfosforilación del EGFR de forma dependiente de la concentración utilizada. La inhibición fue transitoria, revirtiendo espontáneamente entre 1 y 3 h, y reversible, ya que desaparecía inmediatamente al eliminar el donante de NO del medio de cultivo. La interacción del NO con el EGFR era directa, y ocurría a través de una reacción de S-nitrosilación. Las células NB69 expresaron óxido nítrico sintasa (NOS) neuronal e inducible en presencia de suero, pero no en cultivos tratados con EGF o sin factores de crecimiento; al inhibir la actividad NOS hubo un incremento pequeño pero significativo de la proliferación inducida por el suero, indicando que el NO endógeno tenía, al igual que el añadido de forma exógena, un efecto citostático en estas células.

Financiado por FIS00/1080 y SAF2002-02131.

P 119**ESTUDIO AUTORADIOGRÁFICO DE LA DENSIDAD Y FUNCIONALIDAD DEL RECEPTOR 5-HT_{1A} EN LA RATA BULBECTOMIZADA COMO MODELO ANIMAL DE DEPRESIÓN CRÓNICA**

Villanueva M, Martínez-Cue C, Mostany R, Castro ME, García M, Pazos A, Díaz A

Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Cantabria, Santander

La bulbectomía olfatoria bilateral en rata se ha propuesto como un modelo animal válido para estudiar no sólo la patogenia de la depresión sino también el mecanismo de acción de los antidepresivos. En el animal bulbectomizado se observan una serie de alteraciones conductuales y neuroquímicas similares a las encontradas en pacientes deprimidos y que se revierten tras el tratamiento crónico con antidepresivos. En los últimos años, el receptor 5-HT_{1A} ha recibido una particular atención en relación al efecto de los antidepresivos. En este trabajo hemos estudiado la densidad de receptores 5-HT_{1A} en secciones de cerebro de ratas bulbectomizadas mediante la fijación de [³H]8-OH-DPAT y la funcionalidad del receptor 5-HT_{1A} mediante la estimulación en la fijación de [³⁵S]GTPγS por el agonista 8-OH-DPAT (10 μM). Tras la bulbectomía bilateral se observa un incremento significativo en la actividad motora valorada mediante actimetría de 24 h y el test de campo abierto, con un máximo a las dos semanas de la cirugía. En el cerebro de ratas bulbectomizadas no se observaron cambios significativos en la densidad de receptores 5-HT_{1A}. Por otro lado, se detectaron disminuciones significativas en la fijación basal de [35S]GTPγS en el CA1 y giro dentado del hipocampo, pero sin observarse cambios en la estimulación de la fijación de [35S]GTPγS por 8-OH-DPAT en las áreas analizadas.

Financiado por CICYT (BFI-01-0592 y SAF-2002-03189).

P 120**CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DE TRANSDUCCIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LA ACTINA DURANTE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA**

Gómez-Cabrero A, Gual A, Morales M

Laboratorio de Neurofisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Instituto de Investigaciones Biomédicas Agust Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona

La transducción permite la introducción de proteínas recombinantes en células o tejido *in vivo*. Esta técnica está basada en la existencia de péptidos con capacidad de atravesar membranas biológicas. En el presente estudio queremos probar la utilidad de uno de estos péptidos (derivado del factor de transcripción del virus del SIDA, Tat) para estudiar la transmisión sináptica. Para ello hemos construido una serie de proteínas de fusión que contienen el dominio de transducción proteica (PTD) unido a la proteína profilina y otra conteniendo el dominio N-terminal de la sinapsina. Proteínas presentes en el terminal presináptico y relacionadas con la regulación del ciclo sináptico y el citoesqueleto de actina. En primer lugar, hemos estudiado las propiedades funcionales de dos versiones del dominio Tat unidas a profilina: la primera con el PTD original (PTD-wt) de la proteína Tat, y la segunda con una modificación denominada: PTD4. Los niveles de transducción se han estudiado a diferentes tiempos de incubación (a 10, 20, 40 y 60 min y 24 h) utilizando neuronas de hipocampo de rata en cultivo. El estudio de la funcionalidad de la proteína se abordará mediante el uso de técnicas electrofisiológicas en estas mismas células. Los resultados preliminares muestran un alto nivel de transducción, observándose la presencia de acumulaciones de profilina en el citoplasma a partir de los 10 min de incubación. A tiempos de incubación más largos (24 h) se observan grandes acumulaciones de proteína cristalizada.

P 121

ENTRADA DE ZINC Y DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR EN CULTIVOS CELULARES

Varea E, Ponsoda X, Molowny A, Sancho-Bielsa FJ, Nàcher J, Lopez-García C

Unidad de Neurobiología, Departamento de Biología Celular, Universitat de València

La presencia de niveles extracelulares elevados de zinc iónico pueden resultar tóxicos para las células. Diversas patologías neurodegenerativas se han relacionado con alteraciones en la limpieza-eliminación del zinc extracelular en el sistema nervioso central. En este trabajo se ha pretendido caracterizar alguno de los mecanismos de eliminación del zinc extracelular por parte de células nerviosas.

Para visualizar el zinc se ha utilizado el fluorocromo TSQ (N-6-metoxi-p-toluensulfonimida quinolina) (Molecular Probes). Previos estudios en nuestro laboratorio han demostrado que este compuesto no es tóxico y permite visualizar los cambios en concentración en sistemas vivos. El modelo utilizado ha sido la línea celular N1E115 (neuroblastoma de ratón). Estas células pueden diferenciarse a neuronas en presencia de DMSO. Se ha caracterizado la cinética de captura de zinc por parte de cultivos indiferenciados y diferenciados, observándose que las células diferenciadas tienen una mayor eficiencia para captar zinc del medio extracelular.

El exceso de zinc en el citoplasma es tóxico y debe ser eliminado. Cuando la concentración de zinc en el citoplasma es elevada se observa la aparición transitoria de puntos brillantes en el citoplasma (con TSQ). Para caracterizar estas estructuras se han utilizado marcadores de orgánulo: *mito-tracker* (mitocondrias), *liso-tracker* (lisosomas) y FM 1-43 (endosomas). Los resultados muestran que estas estructuras son lisosomas y endosomas.

P 122

QUIMIOSENSIBILIDAD EN CUERPO CAROTÍDEO ADULTO Y MÉDULA ADRENAL NEONATAL DE RATA

Rico AJ, Prieto-Lloret J, González C, Rigual R

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Universidad de Valladolid, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Facultad de Medicina. Valladolid

La médula adrenal (MA) neonatal *in vivo* secreta catecolaminas (CA) frente a la hipoxia independientemente de su inervación. Esta respuesta a la hipoxia se pierde durante el desarrollo al establecerse las sinapsis del nervio esplácnico y se recupera tras la denervación. El incremento de CA plasmáticas consecuente a la hipoxia durante el parto es importante para la adaptación a la vida extrauterina. La MA y el cuerpo carotídeo (CC) comparten origen embriológico y sus células parenquimatosas son sensibles a la hipoxia y ricas en CA.

Nos planteamos estudiar la sensibilidad a la hipoxia de la MA neonatal, midiendo la secreción de CA, y comparar dichas respuestas con la de CC adulto. Utilizamos preparaciones *in vitro* de MA neonatal y de CC adulto superfundidas que permiten registrar la secreción de CA por amperometría con microelectrodos de fibra de carbono. Encontramos que la respuesta secretora en relación al contenido frente a soluciones despolarizantes (30 mM KCl) era similar en ambos órganos ($0,480 \pm 0,370$ frente a $0,364 \pm 0,089$ μM para CC y MA, respectivamente), mientras que frente a hipoxia ($\text{PO}_2 = 25$ Torr) era mucho mayor en el CC ($0,840 \pm 0,320$ frente a $0,011 \pm 0,003$ μM), lo que implica una mayor sensibilidad de este órgano. También se presentarán resultados de la secreción de CA frente a otros grados de hipoxia (10, 7, 5, 2 y 0% O_2) y otros estímulos como la acidosis/hipercapnia. Financiado por FIS (01/0728) a R.R., DGICYT (BF12001-1713) a C.G. y Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (Red Respira C03/011) a ambos.

P 123

CINETICA DE LA EXOCITOSIS EN MASTOCITOS DE UN RATON KNOCK-OUT DE HEPARINANavas S^a, Fernández-Peruchena C^a, Hilfiker S^b, Tabares L^a, Álvarez de Toledo G^a^aDepartamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla. ^bSchool of Biological Sciences, University of Manchester, UK

La heparina, un polisacárido sulfatado, se acumula en el interior de los gránulos de secreción junto a los transmisores naturales de los mastocitos, la histamina y la serotonina. Se ha postulado que su función es la de cubrir las cargas positivas de los transmisores, facilitando la concentración de los mismos en el interior de los gránulos. Para estudiar cómo afecta la heparina la acumulación y la cinética de liberación durante la exocitosis, hemos estudiado la fusión y liberación de vesículas únicas con técnicas electrofisiológicas en mastocitos peritoneales procedentes de un ratón *knock-out* para el gen que codifica para el enzima N-deacetilasa/N-sulfotransferasa-2 (NDST-2), enzima clave para la síntesis de heparina. Se ha descrito que los gránulos de secreción de mastocitos en este ratón poseen una disminución de la capacidad de almacenaje de histamina y de proteasas propias de los mastocitos (Humphries DE, et al. Nature 1999; 400: 769-721). Nuestros experimentos muestran que la capacidad de acumular serotonina en las vesículas de mastocitos se encuentra prácticamente inalterada, mientras que la cinética de liberación del contenido vesicular es más rápida en mastocitos del ratón *knock-out* de heparina que en animales controles. Estos datos sugieren que la liberación de serotonina se produce de forma puramente difusional, a diferencia de lo que ocurre en la situación control. Por otro lado, el retraso existente entre la fusión de la vesícula con la membrana y la liberación de su contenido no se encuentra afectado, indicando que la disociación de la matriz no es el elemento fundamental para la liberación del contenido vesicular.

P 124

KIAA0903 ES UNA NUEVA PROTEÍNA CON HOMOLOGÍA AL EXTREMO N-TERMINAL DE SCAMP1 Y ES UN POSIBLE CONEXIÓN MOLECULAR ENTRE EL CITOESQUELETO Y LA ENDOCITOSIS

Castellano-Muñoz M, García-Junco-Clemente PL, Fernández-Chacón R

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

Las SCAMPs (*secretory carrier membrane proteins*) están involucradas en el tráfico de membranas. SCAMP1, presente en las vesículas sinápticas, posee repeticiones NPF (Asp-Pro-Phe) en su extremo N-terminal que probablemente reclutan moléculas de la maquinaria de la endocitosis. Con objeto de estudiar la existencia de homólogos de las SCAMPs, hemos sondeado bases de ESTs (*expressed sequence tags*). Hemos identificado y secuenciado un cDNA (gen KIAA0903 / DKFZp566N1646) que predice una nueva proteína de 1.231 aminoácidos, denominada KIAA0903, que presenta una combinación de dominios muy peculiar: una región con repeticiones NPF homóloga a SCAMP1 (39% id., 49% hom. en un segmento de 56 aminoácidos) y un dominio de homología a calponina (dominio CH) tipo 2. Curiosamente, se ha sugerido que el dominio CH-2 puede mediar la asociación al citoesqueleto y la unión a PIP2. Estamos analizando a nivel bioquímico y funcional el posible papel de KIAA0903 en la endocitosis. En experimentos preliminares, en los que se ha estudiado la unión de proteínas de cerebro de rata a un fragmento recombinante de KIAA0903 con las repeticiones NPF (aminoácidos 266-341), se muestra la existencia de al menos una proteína que se une a KIAA0903 y a SCAMP1 e indica que la homología de secuencia entre las dos proteínas se traduce bioquímicamente en la unión a una diana común. Estudios funcionales habrán de determinar la relevancia *in vivo* de estas interacciones, junto con la participación del citoesqueleto y el PIP2, en la regulación de la endocitosis en la sinapsis.

Financiado por FIS, MCyT y EMBO-YIP.

P 125**EFFECTO DE LA TOXINA EPSILON DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Soler-Jover A^a, Martín-Satué M^a, Gómez de Aranda I^a, Navarro P^a, Gibert M^b, Popoff MR^b, Blasi J^a

^aDepartament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge. L'Hospitalet de LL., Barcelona, España. ^bCNR Anaérobies, Institut Pasteur. Paris, France

La toxina epsilon de *Clostridium perfringens* es la tercera toxina más potente después de la tetánica y la botulínica. Es producida en forma de protoxina inactiva, que requiere de dos cortes proteolíticos para ser activada. Causa una enterotoxemia fatal en animales de granja. Incrementa la permeabilidad vascular y causa edema generalizado. Su letalidad depende de la unión específica a cerebro, donde causa los mayores efectos patológicos. Algunos de estos efectos se han observado también en ratones inyectados con la toxina. Otro buen modelo para estudiar sus efectos es la línea celular MDCK, una de las pocas sensibles a la toxina. En este trabajo hemos construido proteínas de fusión entre la GFP y tanto la protoxina como la toxina activa, para estudiar sus efectos en células MDCK y su distribución y toxicidad en ratones. El análisis *post-mortem* de estos animales reveló muerte neuronal en zonas concretas de la corteza cerebral y del hipocampo. Estudios sobre cultivos primarios neuronales revelaron que la toxina es capaz de unirse específicamente a la membrana celular, pero no de inducir la muerte neuronal. La incubación de cortes histológicos de cerebro con las proteínas de fusión demostró la unión específica de la toxina en diferentes regiones del cerebro. Dobles marcejes con anticuerpos revelaron el predominio de la unión sobre grandes tractos de fibras nerviosas, fundamentalmente mielínicas.

Agradecimientos: Instituto de Salud Carlos III, MEC, Generalitat de Catalunya.

P 126**DISTRIBUCIÓN DE ISOFORMAS DE SINAPTOSREBINA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA**

Raptis A, Gómez de Aranda I, Navarro P, Blasi J

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge. L'Hospitalet de LL., Barcelona

El proceso de fusión de membranas implicado en la exocitosis de neurotransmisores requiere la acción de tres proteínas SNARE: sintaxina y SNAP-25 (situadas en la membrana plasmática de la neurona presináptica) y sinaptobrevina (ancorada en la vesícula sináptica). Estas proteínas interactúan entre sí formando el complejo SNARE, esencial para la fusión entre la vesícula y la membrana plasmática. Para cada una de estas tres proteínas se han encontrado al menos dos isoformas: sinaptobrevina I y II, sintaxina 1A y 1B, y SNAP-25 a y b. En estudios *in vitro* con proteínas recombinantes se ha visto una tendencia a encontrar sinaptobrevina I asociada a sintaxina 1B, y sinaptobrevina II preferentemente con sintaxina 1A, aunque ambas isoformas de sinaptobrevina pueden interactuar con cualquier isoforma de sintaxina. En este trabajo analizamos la distribución de isoformas de sinaptobrevina I y II, y su correlación con la distribución de isoformas de sintaxina 1A y 1B en cerebro de rata, mediante técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos de isoforma. Los resultados obtenidos revelaron una localización parcialmente diferencial de las isoformas de sinaptobrevina, estando la isoforma II más ampliamente distribuida que la I. Sin embargo, a partir de nuestros resultados no pudimos establecer un patrón de colocación entre isoformas concretas de ambas proteínas, tal como se había descrito previamente en estudios *in vitro*.

Agradecimientos: Fundació August Pi i Sunyer. M.C.Y.T.

P 127**LA LÍNEA CELULAR DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y COMO MODELO PARA ESTUDIAR LA SECRECIÓN REGULADA DE LA PREPROINSULINA-GFP**

Torrejón-Escribano B, Gómez de Aranda I, Navarro P, Blasi J

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Universitat de Barcelona, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge, Laboratori de Neurobiologia Cel·lular i Molecular. L'Hospitalet de LL., Barcelona

Las proteínas SNARE se encuentran en toda la vía de secreción regulada tanto del sistema nervioso como del endocrino organizando el movimiento membranario en células eucariotas. La secreción de insulina es uno de los modelos más utilizados para estudiar la maquinaria exocitótica en el sistema endocrino, pero todavía existen aspectos importantes que permanecen desconocidos. Para entender mejor su regulación mediante las proteínas SNARE, hicimos una proteína de fusión entre la preproinsulina de rata seguida de la EGFP. Transfectamos diferentes líneas celulares para intentar determinar si la preproinsulina-GFP era procesada a insulina-GFP madura y su comportamiento ante diferentes agentes secretorios (como el TPA, la glucosa y el carbachol). Obtuvimos diferentes clones transfectados establemente de SH-SY5Y y de INS-1 (línea de insulinoma de rata) para estudiar la vía secretora regulada y de 29.3T (línea epitelial de riñón humano) para estudiar la vía secretora constitutiva. La expresión y maduración de la preproinsulina-GFP en estos clones fue estudiada por diferentes técnicas como el *Western blot*, ELISA para medir la secreción de insulina-GFP, métodos fluorimétricos para analizar la diferencia entre la estimulación y la no estimulación, y microscopía confocal para ver la distribución y colocalización de la insulina-GFP con las proteínas SNARE.

Agradecimientos: Fundació La Marató de TV3, Fundació August Pi i Sunyer y al MCYT (proyecto BMC2002-01697).

P 128**LIBERACIÓN DE ATP EN CONDICIONES DE ESTRÉS HIPERTÓNICO**

Martín-Satué M, Aleu J, Navarro P, Solsona C

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Laboratori de Neurobiologia Cel·lular, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona

El estrés mecánico induce la liberación de ATP en diversos tipos celulares tanto neuronales, donde el ATP se libera durante la transmisión sináptica, como no neuronales (astrocitos, células musculares o células endoteliales como ejemplos). En este trabajo hemos estudiado la liberación de ATP en ovocitos de *Xenopus* sometidos a estrés hipertónico. En estas condiciones, los ovocitos presentan una disminución de volumen que coincide con la activación de una corriente de entrada así como con una salida de ATP. Hemos excluido la liberación de ATP mediante exocitosis ya que la inyección intracelular de la cadena ligera de la toxina tetánica, un potente inhibidor de la exocitosis, no modifica la liberación de ATP y tampoco la corriente iónica. La liberación de ATP por estrés osmótico es reversible a tiempos cortos, pero en estimulaciones prolongadas (más de 30 minutos) no se produce liberación de ATP aunque sí disminución de volumen. Dado que el ATP medido resulta del equilibrio entre el ATP liberado y su degradación mediante ectoenzimas, también hemos medido la actividad NTPDásica en las mismas condiciones de estrés. De estos experimentos concluimos que la hidrólisis de ATP dependiente de calcio se ve inhibida en más de un 50 % en situaciones de hipertonicidad. Destacamos el papel clave de la proteína CD39 en todo este proceso ya que, en las condiciones experimentales anteriores, ovocitos inyectados con oligonucleótidos antisense del RNA de CD39 liberan menos ATP que los correspondientes controles inyectados con agua.

Agradecimientos: Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI2001-331), DURSI Generalitat de Catalunya, La Marató de TV3.

P 129

CARGA Y DESCARGA DE NEUROTRANSMISORES DE LA MATRIZ DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS

Elías M, Reigada D, Bahima L, Gómez de Aranda I, Marsal J, Blasi J, Solsona C

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

Recientemente hemos demostrado que las vesículas sinápticas colinérgicas contienen una matriz que se comporta como un hidrogel. Esta matriz es capaz de retener y liberar la acetilcolina y el ATP por uniones electrostáticas y mecanismos de intercambio iónico. Hemos probado si esta matriz es específica para almacenar acetilcolina y ATP o puede almacenar otros neurotransmisores. A partir de vesículas sinápticas colinérgicas aisladas del órgano eléctrico de *Torpedo marmorata*, se procedió al vaciado de la matriz intravesicular del neurotransmisor que contenía originariamente (acetilcolina) mediante un choque osmótico y una serie de diálisis secuenciales. Seguidamente, se incubó esta matriz en un medio con alta concentración de dopamina para cargarla con este nuevo neurotransmisor. La dopamina queda fijada a la matriz y se libera al aumentar la fuerza iónica. Igualmente se procedió a recargar la matriz con glutamato, que igualmente se liberaba en función de la fuerza iónica aplicada. Concluimos que la matriz es inespecífica y puede retener cualquier tipo de neurotransmisor, tanto de tipo catiónico como de tipo aniónico. Este trabajo está financiado por el MCyT (BFI2001-331). M. Elías es becario del MCyT.

P 130

LIBERACIÓN CELULAR DE ATP A TRAVÉS DE HEMICANALES

Bahima L, Muhaisen A, Aleu J, Elías M, Martín-Satué M, Navarro P, Texidó L, Marsal J, Solsona C

Departament de Biologia Cel.lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

En el estudio hemos investigado la permeabilidad de las conexinas para ATP. El modelo experimental utilizado han sido los oocitos de *Xenopus laevis* en los que se ha monitorizado el paso de corriente por fijación de voltaje con dos electrodos y la liberación de ATP mediante la reacción quimioluminiscente de la luciferina-luciferasa. Hemos medido las corrientes y la liberación de ATP a través de la conexinas endógenas (Cx38). Los hemicanales se han estimulado con soluciones libres de cationes divalentes, que generaron una corriente de entrada (1 μ A, n=12). La especificidad de esta activación se comprobó utilizando octanol y ácido flufenámico. Los oocitos inyectados con oligonucleótido antisentido para la Cx38 presentan una menor corriente (500 nA, n=12). La activación de las corrientes permite el paso de Lucifer Yellow, y se inactiva en presencia de iones divalentes. Hemos estudiado el curso temporal de la liberación de ATP en ausencia de iones divalentes. A los 10 minutos hemos detectado 0,9 pM ATP/ovocito en los ovocitos control, mientras que en presencia de ácido flufenámico fue de 0,5 pM ATP/ovocito y en los ovocitos inyectados con oligonucleótido antisentido para la Cx38 fue de 0,02 pM ATP/ovocito. Esto indica que la señalización extracelular de ATP puede originarse a partir de los hemicanales. Financiado por MCyT (BFI 2001-331). L.B. es becaria del MCyT.

Dolor y analgesia

P 131

LA VALORACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANALGÉSICA DE LA MEDETOMIDINA EN EL DOLOR INFLAMATORIO DEPENDE DE LA FASE DE LA INFLAMACIÓN Y DEL TIPO DE ESTIMULACIÓN

Molina C, Herrero JF

Departamento de Fisiología, Universidad de Alcalá, Madrid

El agonista 2-adrenérgico medetomidina (MED) posee propiedades analgésicas, aunque su efecto en distintas fases de la inflamación no es bien conocido. Se estudió la actividad antinociceptiva de 20, 40 y 80 μ g/kg de MED IP en ratas Wistar macho a las 4, 20 y 44 h de inflamación de tejido blando por carragenina, en reflejos de retirada evocados por estimulación térmica y mecánica. El nivel de inflamación se midió por pletismometría. El mayor efecto con todas las dosis se observó a los 30 min de su administración. La dosis de 80 μ g/kg provocó una inhibición completa en todas las pruebas, pero con signos de sedación. Se observaron fenómenos claros de alodinia e hiperalgesia mecánicas en la pata inflamada, que fueron inhibidos de forma dosisdependiente por la MED. La inhibición de la alodinia fue más potente en los estadios finales de la inflamación que en los iniciales. Sin embargo, en hiperalgesia, la dosis de 40 μ g/kg de MED fue más efectiva a las 4 h de la inflamación (91%) que a las 20 h (61%) y a las 44 h (56%). La hiperalgesia térmica sólo se observó en las primeras 4 h de la inflamación. En este caso, las dosis efectivas de MED fueron 40 y 80 μ g/kg (41 y 72%, respectivamente). No se observó variación alguna en el nivel de inflamación. Los resultados indican que el estadio de la inflamación es muy determinante de la efectividad analgésica de la MED y, aunque su efecto es dosisdependiente, varía con respecto al tipo de estimulación aplicada. Financiado por MCyT (SAF2001-1048-C03-03).

P 132

ESTUDIO DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LOS NUEVOS AINE NITRODERIVADOS DEL S-KETOPROFENO, HCT-2037 Y HCT-2040 EN RATAS

Gaitán G, Ahuir FJ, Herrero JF

Departamento de Fisiología, Universidad de Alcalá, Madrid

El S-ketoprofeno (S-KET) es un fármaco efectivo en el tratamiento del dolor pero posee efectos adversos. La unión de donadores de NO y AINE ha dado lugar a fármacos más efectivos. Se comparó el efecto antinociceptivo del S-KET y de sus nitroderivados HCT-2037 y HCT-2040 en unidades motoras aisladas (UMA) de ratas Wistar anestesiadas con cloralosa, y en experimentos de comportamiento en ratas sin anestesia. Los fármacos se administraron IV cada 21 min en dosis de 0,1 a 12,8 μ M/kg en experimentos de UMA y PO 1-8 μ M/kg en los de comportamiento. En UMA el HCT-2037 demostró ser más potente y efectivo que el S-KET y que el HCT-2040 con unas DE50 de 0,7, 1,3 y 1,6 μ M/kg respectivamente en respuestas a la estimulación mecánica nociva. El HCT-2037 fue el único que disminuyó significativamente el wind-up indicando un mecanismo de acción distinto. En experimentos de comportamiento, se comparó el efecto del HCT-2037 y del S-KET en animales con inflamación. El HCT-2037 fue más efectivo que el S-KET. El efecto máximo de recuperación de la hiperalgesia observado fue del 90%, en contraste con el S-KET cuyo efecto fue del 48%. En estimulación térmica, el efecto máximo observado fue del 62% con el HCT-2037 y del 49% con el S-KET. En conclusión, el HCT-2037 es un fármaco más potente y efectivo que el S-KET y el HCT-2040, en estimulación mecánica, eléctrica y térmica. Este trabajo ha sido financiado por NicOx S.A. y por el MCyT (SAF2001-1048-C03-03).

P 133**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTINOCICEPTIVAS DE LA N- CICLOPENTIL ADENOSINA EN ANIMALES CON INFLAMACIÓN DE TEJIDO BLANDO**

Ramos-Zepeda G, Herrero JF

Departamento de Fisiología, Universidad de Alcalá, Madrid

La adenosina es un nucleósido endógeno de la purina con funciones en el sistema nervioso. Se investigaron los efectos antinociceptivos de su análogo N-ciclopentil adenosina (CPA) y de los antagonistas CPT y naloxona en animales espinalizados y no espinalizados. Se registraron unidades motoras aisladas (UMA) activadas por estimulación nociva mecánica y eléctrica (*wind-up*) en ratas Wistar machos con inflamación. La administración de los fármacos se realizó por vía intravenosa, en dosis acumulativas (10 a 320 µg/kg). En animales intactos la CPA provocó un descenso significativo de las respuestas a estimulación mecánica, con una reducción máxima del $23 \pm 12\%$ del control y una DE50 de $95 \pm 1,3 \mu\text{g/kg}$. El *wind-up* descendió hasta un 58% del control. Las respuestas no fueron revertidas por CPT, pero sí lo fueron por el antagonista opiáceo naloxona (1 mg/kg). La CPA produjo una intensa hipotensión tanto en animales espinalizados (43% del control) como en los no espinalizados (37%). En ambos casos, la administración de CPT revirtió el efecto. En animales intactos la administración de CPA no modificó las respuestas a estimulación mecánica y eléctrica. Los resultados sugieren un importante efecto antinociceptivo de la CPA ejercido en zonas supraespinales. El efecto no parece específico del sistema de adenosina a las dosis estudiadas y los resultados implican a los sistemas opiáceos. Financiado por Grünenthal y MCyT (SAF2001-1048-C03-03). G. Ramos es becario de la AEIC.

P 134**IMPLICACIÓN DEL ÁCIDO RETINOICO EN EL SISTEMA NOCICEPTIVO**

Romero-Sandoval A, Herrero JF

Departamento de Fisiología, Universidad de Alcalá, Madrid

El ácido retinoico (AR) está presente en el SNC pero su papel es desconocido. Se estudió su posible implicación en nocicepción realizando experimentos en ratas Wistar anestesiadas con cloralosa, normales (N) y con inflamación (I), tratadas con AR o con el vehículo (V). Se registraron unidades motoras aisladas (UMA) activadas por estimulación mecánica y eléctrica. En cada unidad se caracterizó el campo receptor cutáneo, el umbral de activación con estimulación mecánica, el umbral de fibras C con estimulación eléctrica y la frecuencia de disparo con 10s de estimulación mecánica. El campo receptor fue significativamente mayor en los grupos con AR (N: $3 \pm 0,3 \text{ cm}^2$; I: $4,5 \pm 0,3$) que en los grupos con vehículo (N: $1,39 \pm 0,2$; p<0,01; I: $3 \pm 0,3$; p<0,01). El umbral para estimulación mecánica fue significativamente menor en los grupos tratados con AR (N: $64 \pm 2 \text{ mN}$; I: $30 \pm 1 \text{ mN}$) que en los de vehículo (N: 54 ± 2 ; p<0,001; I: 24 ± 1 ; p<0,01). El umbral de activación de fibras C fue menor en animales con AR ($0,29 \pm 0,1 \text{ mA}$, p<0,05) que en vehículo ($0,61 \pm 0,1 \text{ mA}$). La frecuencia de disparo con estimulación mecánica fue similar en todos los grupos, media de 34 ± 1 espigas. Los resultados muestran que el AR está implicado en nocicepción, facilita la aparición de respuestas nociceptivas mediante la disminución del umbral de respuesta a estímulos mecánicos y del umbral de activación de fibras C. Financiado por el MCyT (SAF2001-1048-C03-03). E. Alfonso Romero es becario de la AEIC.

P 135**LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SUSTANCIA GRIS PERIACUEDUCTAL MESENCÉFALICA PARTICIPAN EN LOS EFECTOS DE RECOMPENSA Y ANALGESIA DE LA HEROÍNA**Flores JA, Fernández-Espejo E, El Banoua F, Galán B, Caraballo I
Departamento de Fisiología Médica, Universidad de Sevilla

El circuito dopaminérgico de la sustancia gris periacueductal mesencefálica (PAGm) fue descrito hace años (Lindvall y Bjorklund, 1974). Sin embargo, considerando el papel crucial de la dopamina (DA) en la adicción opiácea, sorprende que este circuito ha sido ignorado en estudios de adicción. Además, la PAGm es crítica en los efectos analgésicos de los opiáceos, pero el papel nociceptivo de las neuronas dopaminérgicas de esta región no se conoce. Los objetivos fueron: 1) describir la morfología del circuito dopaminérgico de la PAGm, 2) verificar si estas células se activan tras heroína, y 3) estudiar los efectos de la lesión selectiva de las neuronas DA de la PAGm en la adicción a heroína, medida mediante preferencia de lugar (efectos reforzadores) y actividad motora (efectos sensibilizadores), así como en la analgesia opiácea. La nocicepción se evaluó mediante el test de inmersión de la cola (reflejo medular) y la placa caliente (respuesta dolorosa supramedular). La histología reveló la presencia de células DA (TH+/DBH-) en la PAGm de 15 a 30 µm de diámetro (número estimado: $129,4 \pm 31,3$). Estas células se activaban tras heroína, pues expresaban c-Fos. Tras la lesión dopaminérgica (68,4% de pérdida celular, 80,7% de reducción de DA), la preferencia de lugar tras heroína se anuló (p<0,05), aunque no la sensibilización motora. Además, la curva dosis-respuesta de dolor tras la heroína se desplazó a la derecha en la placa caliente, indicando que la analgesia se atenuó. En resumen, el circuito dopaminérgico de la PAGm se activa tras la heroína, media efectos reforzadores de la droga, y participa en las respuestas analgésicas supramedulares del opiáceo.

Financiado a EFE por Ministerio de Ciencia y Tecnología, Plan Andaluz de Investigación, y Plan Nacional sobre Drogas.

P 136**EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON AMLODIPINO Y METADONA INDUCE SUPERSENSIBILIDAD A LA ACCIÓN ANALGÉSICA DEL OPIOIDE ASOCIADA A UNA MAYOR ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA G ACOPLADA AL RECEPTOR OPIOIDE MU**

Díaz A, Santamaría J, Mostany R, Riancho V, Ayesta FJ

Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Cantabria, Santander

Estudios previos demuestran que el tratamiento crónico y concurrente de antagonistas del calcio con agonistas opiáceos no sólo previene la expresión de tolerancia sino que induce supersensibilidad a la acción analgésica del opiáceo. En este trabajo hemos valorado el efecto de la interacción crónica entre amlodipino y metadona sobre la acción analgésica del opiáceo así como las modificaciones en el sistema de transducción (proteína G) acoplado al receptor opiáceo mu. Las ratas fueron tratadas durante 14 días con: a) metadona (3 mg/kg, SC) y b) metadona (3 mg/kg, SC) + amlodipino (1 mg/kg, SC). El efecto analgésico de la metadona (0,1-10 mg/kg, SC) se valoró mediante el test del *tail-flick*. La actividad de la proteína G se cuantificó, en secciones autorradiográficas, mediante la estimulación de la fijación de [³⁵S]GTPγS por el agonista DAMGO (0,01-100 µM) en el asta dorsal espinal. La administración crónica de metadona produjo un desplazamiento a la derecha de la curva dosis-efecto de la acción analgésica de la metadona respecto al control pero sin cuantificarse cambios en la potencia (CE50) o eficacia (Emax) del DAMGO para estimular la fijación de [³⁵S]GTPγS. Tras la administración crónica y concurrente de amlodipino y metadona se observó una potenciación de la acción analgésica del opiáceo a dosis bajas asociada a una mayor potencia del DAMGO (CE50) para estimular la fijación de [³⁵S]GTPγS aunque con la misma eficacia que en ratas control o tolerantes.

P 137**LA ANALGESIA INDUCIDA POR LA RESTRICCIÓN CALÓRICA ESTÁ MEDIADA POR MODIFICACIONES DEL SISTEMA OPIÁCEO κ**

De los Santos M, Sierra-Domínguez SA, Fontanella GH, Delgado-García JM, Carrión AM

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

Trabajos recientes indican que la esperanza de vida de muchas especies puede ser aumentada hasta un 50% reduciendo su ingesta y manteniendo el aporte de nutrientes esenciales (restricción calórica, RC). Además, se acepta que la RC en mamíferos reduce también la incidencia de cáncer, enfermedades cardiovasculares y déficit de la función inmunitaria relacionada con la edad. Aunque los beneficios de la RC sobre los sistemas cardiovascular, inmune y endocrino han sido suficientemente demostrados, su efecto sobre el sistema nervioso está siendo estudiado en la actualidad. En nuestro laboratorio, hemos obtenido resultados que indican que ratones mantenidos en RC sufren una marcada analgesia en modelos de dolor periférico visceral y térmico. Análisis farmacológicos y de biología molecular muestran que la analgesia inducida en animales sometidos a RC está mediada por una sobreactivación del sistema opiáceo κ , comparado con animales alimentados *ad libitum*. Para conocer el papel del sistema opiáceo κ , se ha determinado la expresión de la proteína c-fos en la médula espinal, como marcador de activación neuronal inducida por estimulación nociceptiva. Si bien los animales alimentados *ad libitum* poseen una marcada inducción de c-fos en las láminas más superficiales de la médula espinal, ésta no ocurre en animales mantenidos en RC. Estos resultados sugieren que el sistema opiáceo κ podría estar bloqueando el flujo de información nociceptiva que llega a la médula espinal desde los receptores. Así, el tratamiento con agonistas del sistema opiáceo κ , o, alternativamente, la RC podrían constituir el fundamento de una terapia adicional en el tratamiento de dolor.

Trabajo financiado por La Caixa, JA/CVI-122, FISSS (01-0194) y DGICYT (BFI2002-00936).

P 138**LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE MORFINA REGULA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL mRNA DE LAS PROTEÍNAS RGS DE LA SUBFAMILIA R7 EN ÁREAS DEL SNC DEL RATÓN**López-Fando A, Rodríguez-Muñoz M, Garzón J, Sánchez-Blázquez P
Neurofarmacología, Instituto Cajal, CSIC. Madrid

Las proteínas RGS participan en la modulación de las vías de señalización de receptores acoplados a proteínas G. La subfamilia R7 que incluye los tipos RGS6, 7, 9 y 11, posee un dominio (GGL) de unión a la proteína Gbeta5, siendo la formación de heterodímeros RGS/beta5 indispensable para ejercer su actividad funcional. Trabajos previos del grupo han demostrado que proteínas de esta subfamilia, RGS7 y RGS9, producen cambios en la potencia y duración de la analgesia opiode. Animales *knockdown* para la proteína de anclaje Gbeta5 manifiestan los mismos cambios funcionales. El presente trabajo se ha diseñado para establecer la participación de ciertas RGS en los mecanismos adaptativos inducidos tras la administración aguda y crónica de morfina. Para el análisis de posibles cambios en los niveles de los mRNA de la subfamilia R7 y la Gbeta5 empleamos RT-PCR semicuantitativa (referida a la expresión de GAPDH). Nuestros datos confirman la presencia del mRNA de las RGS y la Gbeta5 en las áreas evaluadas: PAG, tálamo, corteza y estriado. La administración icv de una dosis aguda de morfina (DE80) no modificó de forma significativa los niveles de los diferentes mensajeros. Sin embargo, 24 o 48 horas tras la implantación de una suspensión de lenta liberación (pellet de morfina) los niveles de los mRNA aumentaron para todas las RGS, manteniéndose en algunos casos durante más de 15 días. La subida más acusada (>300 %) se obtuvo para la RGS9 en áreas

relacionadas con la nocicepción, PAG y tálamo. El mRNA de la Gbeta5 cambió de forma paralela a las RGS. Estos resultados demuestran que la inducción de proteínas RGS/Gbeta5 contribuyen a la desensibilización (tolerancia) que se observa en respuesta a la presencia crónica de morfina.

Financiado por FIS01/1169 y MCYT BMC2002-03228.

P 139**RGS9-2 Y RGS20, PROTEÍNAS REGULADORAS DE LAS PROTEÍNAS G: DISTRIBUCIÓN EN SNC Y PAPEL FUNCIONAL SOBRE LOS EFECTOS DE LA MORFINA**Rodríguez-Muñoz M, López-Fando A, Sánchez-Blázquez P, Garzón J
Neurofarmacología, Instituto Cajal, CSIC. Madrid

Las proteínas RGS ejercen un papel esencial en la regulación de los efectos mediados por receptores G. Estudios *in vitro* indican cierta selectividad de las RGS por subtipos de proteínas G. RGS9 regula señales que implican las Gi/o y RGS20 modula preferentemente la Gz. El receptor opiode mu, responsable de la analgesia de morfina, activa diferentes proteínas G, incluidas Gi2 y Gz, pudiendo estar limitada la intensidad del efecto por ambas RGS. Este trabajo compara la presencia y distribución de RGS9 y RGS20 en SNC de ratón. Nuestros datos demuestran la presencia del ARNm de RGS9, su proteína de anclaje Gbeta5 y RGS20 en cerebro de ratón, y de las respectivas proteínas codificadas. Los anticuerpos detectan una única banda de 27 kDa (RGS20), 77 kDa (RGS9) y 39 kDa (Gbeta5). El análisis de la señal inmunoreactiva en diversas estructuras cerebrales muestra una amplia distribución. Los niveles más abundantes aparecen en bulbo raquídeo, estriado y tálamo (RGS20); estriado, hipotálamo y PAG (RGS9). La administración subcrónica de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODN) frente al ARNm que codifica estas proteínas disminuye la señal inmunorreactiva, indicando selectividad del marcaje y eficacia del tratamiento con los ODN. Los *knockdown* muestran un aumento significativo en la potencia analgésica de la morfina. Animales tratados con ODN-RGS20 desarrollan menos taquifilaxia aunque presentan la tolerancia que aparece 24 horas tras la administración de una dosis aguda (DE80) de morfina. En cambio, ratones *knockdown* para RGS9 o Gbeta5 no muestran desensibilización al opiode. Estos datos confirman que la potencia analgésica y el desarrollo de tolerancia a morfina son dos procesos regulados de forma diferencial por distintos subtipos de RGS. Financiado por FIS01/1169 MCYT BMC2002-03228.

P 140**INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MORFINA SOBRE LOS PROCESOS DE PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR EN EL SNC DE RATÓN**

Pérez San Emeterio E, Hurlé MA

Dpto. de Fisiología y Farmacología, Universidad de Cantabria. Santander

Hemos analizado el efecto de la administración crónica de morfina y la abstinencia precipitada con naltrexona sobre los procesos de neurogénesis y muerte celular en el sistema nervioso central de ratón. Mediante inmunohistoquímica se valoró el número de células marcadas con bromodeoxiuridina. En los animales tratados crónicamente con morfina y en los abstinentes se produjo una reducción significativa del número de células marcadas en la región del arco hipocámpal. Mediante *Western blot*, se valoró en lisados de hipocampo la regulación de miembros de la familia BCL-2 proapoptóticos (BAX y BAD) y antiapoptóticos (BCL-2 y BCL-XL). BAD aumentó significativamente durante la tolerancia ($144,8 \pm 15\%$) y la abstinencia ($133 \pm 18\%$). BAX mostró tendencia al aumento en animales abstinentes ($111 \pm 5\%$). Por el contrario, BCL-2 disminuyó durante la abstinencia ($88 \pm 15\%$). Nuestros resultados indican que el tratamiento crónico con morfina y la

abstinencia provocan una inhibición en la proliferación celular y promueven procesos apoptóticos en el SNC de ratón.

Financiación: FISS (G03/005) y Fundación Valdecilla (02/A18).

P 141

ESTUDIO ESTEREOLÓGICO DE LOS EFECTOS DE LA GABAPENTINA SOBRE LAS NEURONAS GABA-INMUNORREACTIVAS EN LOS NÚCLEOS PRINCIPAL Y CAUDAL DEL TRIGÉMINO Y EN EL ÁREA DE 'BARRILES' CORTICALES EN LA RATA

Machín R, Bermejo PE, Avendaño C

Dpto. Morfología, Facultad de Medicina,
Univ. Autónoma de Madrid. Madrid

La gabapentina (GP), un análogo estructural del GABA, es un fármaco antiepiléptico que ha mostrado recientemente ser eficaz en el tratamiento del dolor neuropático, aunque se desconoce su mecanismo de acción. En base a la hipótesis de un mecanismo gabérgico de su acción, hemos aplicado GP por vía SC (2×150 mg/kg/día, 3 días) en ratas macho Sprague-Dawley adultas. Los cerebros se fijaron con paraformaldehído, se cortaron en vibratomo a 80 micras y las secciones se incluyeron planas en Durcupan. Zonas muestreadas sistemáticamente de los núcleos trigeminales caudal (Vc) y principal (Vp) y de la región de 'barriles' de la corteza (BF) se seccionaron seriadamente a 1 micra. Se inmunotñieron con atc. monoclonal anti-GABA (C. Matute, clon 3D5) y se contaron los cuerpos marcados aplicando el disector físico con ayuda de un equipo estereológico CAST-GRID. El mismo proceso se realizó con animales control. La GP produjo una disminución significativa en el número de neuronas GABA+ en todas las zonas, con reducción de la intensidad global de marcado, aunque se mantuvo un marcado intenso de las fibras y los botones GABA+ del neuropilo. Estos resultados dejan abierta la cuestión de si esta disminución se debe a una regulación a la baja en la síntesis y expresión de GABA o a una depleción en los somas con un aumento de su recambio. R.M. disfruta de una beca predoctoral de la Fundación UPSA.

P 142

REDUCCIÓN DE LAS RESPUESTAS A ESTIMULACIÓN TÉRMICA NOCIVA DE NEURONAS DE LÁMINA I DE LA MÉDULA ESPINAL EN RATONES CARENTES DEL GEN DE LA PREPROTAUQUININA A (PPT-A)

Mazario J^a, Cao YQ^b, Basbaum AI^a

^a Department of Anatomy, University of California. San Francisco, USA.

^b Department of Molecular and Cellular Physiology, Stanford University. USA

Introducción. Los péptidos derivados del gen de la ppt-A, sustancia P (SP) y neurokinina A (NKA), están implicados en la transmisión de mensajes nociceptivos, pero su contribución a el dolor agudo y crónico sigue sin aclarar. En este estudio se han empleado ratones en los que el gen ppt-A ha sido delecionado.

Material y métodos. Se utilizaron ratones (20-40 g) +/- y -/- para el gen ppt-A anestesiados con uretano 10% (1,3 g/kg, IP). La temperatura del animal se mantuvo en torno a los 37 °C. Se registró la actividad de neuronas de rango dinámico amplio de lámina I de la médula espinal mediante un electrodo de tungsteno insertado entre 20 y 200 µm de profundidad. Se aplicaron estímulos térmicos al campo receptivo de la neurona a través de una sonda de cobre de 9 mm² durante 10 s a 40, 45 y 50 °C.

Resultados. No se observaron diferencias significativas entre ratones +/- y -/- en la actividad espontánea de las neuronas ni en la frecuencia de disparo evocada por estímulos a 40 y a 45 °C. La frecuencia de disparo evocada durante los primeros 5 s de estimulación a 50 °C fue significativamente menor ($p < 0,05$) en los ratones -/- ($16,3 \pm 5$ Hz) que en los +/- ($37,6 \pm 9$ Hz).

Conclusiones. La presencia de SP y NKA es necesaria para la correcta codificación de los estímulos térmicos nocivos de alta intensidad en neuronas de lámina I de la médula espinal mientras que no es imprescindible para la codificación de estímulos térmicos no nocivos o nocivos de baja intensidad.

Desarrollo y plasticidad

P 143

EFFECTOS DE LA DEPRIVACIÓN SENSORIAL OLFATORIA SOBRE LA INERVACIÓN CENTRÍFUGA DEL BULBO OLFATORIO DE LA RATA

Gómez C, Barbado MV, Briñón JG, Recio JS, Aijón J, Alonso JR

Departamento de Biología Celular y Patología, Universidad de Salamanca

Los tres sistemas centrífugos enteramente extrínsecos al bulbo olfatorio son el sistema colinérgico, el noradrenérgico y el serotoninérgico. Dichos sistemas participan en la modulación de la información olfatoria y están involucrados en procesos de aprendizaje y memoria olfatoria. Dados los conocidos efectos de la privación olfatoria en los elementos intrínsecos de la vía olfatoria primaria, que incluyen cambios citoarquitectónicos, neuroquímicos y fisiológicos, nos planteamos estudiar la respuesta de los sistemas moduladores centrífugos a la ausencia de estimulación aferente. Este estudio se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica para la detección de serotonina o dopamina-β-hidroxilasa (DBH) y la histoquímica para la acetilcolinesterasa en animales privados unilateralmente.

Nuestros resultados indican diferencias en el patrón de inervación serotoninérgica y noradrenérgica recibida por el bulbo olfatorio ipsilateral a la nariz ocluida, mientras que la colinérgica se mantiene constante. Los cambios se resumen en un aumento de inervación serotoninérgica, la reducción de fibras noradrenérgicas y la aparición de glomérulos específicos con una alta densidad de fibras DBH-positivas. Estos datos demuestran la existencia de plasticidad en los sistemas moduladores centrífugos que pueden reflejar mecanismos favorecedores de la adaptabilidad del sistema a la ausencia de estimulación periférica.

Trabajo subvencionado por la DGES (PM99-0068) y Junta de Castilla y León.

P 144

MAPEO DE TERRITORIOS PRESUNTIVOS DE LA ZONA DE TRANSICIÓN DIENCÉFALO-TELENCEFÁLICA EN EL EMBRIÓN DE POLLO DE DOS DÍAS DE INCUBACIÓN

Alonso MA^a, Botella M^a, Delgado AC^a, Delgado FJ^a, Damas MC^b, Trujillo CM^a

^a Departamento de Microbiología y Biología Celular. ^b Departamento de Psicología Educativa, Evolutiva y Psicobiología, Universidad de La Laguna

Caudal a las vesículas telencefálicas se sitúan la eminencia talámica (EMT), el tálamo ventral (TV), el tálamo dorsal (TD) y el *pretectum*. Nosotros hemos realizado un mapa de territorios presuntivos de la placa alar en la zona de transición entre el diencéfalo y el telencefalo con el objetivo de delimitar las regiones que forman parte de ella y estudiar sus relaciones de vecindad, realizando trasplantes homotópicos y homocrónicos entre embriones de pollo y codorniz del estadio HH-10 (10 a 12 somitas). Las quimeras resultantes se sacrificaron en distintos estadios del desarrollo. Nuestro análisis nos permitió constatar que el TD, el TV y la EMT son territorios contiguos en el prosencéfalo. Rostral a la EMT se encuentran los territorios presuntivos del hipocampo y el septo que ocupan una pequeña región medial del prosencéfalo secundario, mientras que el

córtex caudal comprende un campo mediolateral más amplio. Hemos obtenido trasplantes que sólo comprometen la porción más dorsal de la EMT, procedentes de zonas mediales del territorio prosencefálico, constatando que células originadas allí migran ventralmente sin salir de ella, y que algunas pasan al telencéfalo caudal, mientras que trasplantes realizados en zonas laterales originan porciones ventrales de la EMT y células que migran hacia el telencéfalo, rodeando al fascículo lateral y llegando algunas hasta el bulbo olfatorio. La EMT ocupa una estrecha franja por delante del territorio del TV en la placa alar prosencefálica.

P 145

EFFECTOS DE LA CAUTIVIDAD EN LA NEUROGÉNESIS DEL LAGARTO ADULTO

Damas MC^a, Delgado FJ^b, Alonso MA^b, Delgado AC^b, García-Verdugo JM^c, Trujillo CM^b

^aDepartamento de Psicología Educativa, Evolutiva y Psicobiología, Universidad de La Laguna. ^bDepartamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de La Laguna. ^cDepartamento de Parasitología y Biología Celular. Universidad de Valencia

Los reptiles adultos conservan la capacidad de generar nuevas células cerebrales. Diversos estudios han concluido que estas células son neuronas. Su tasa de neurogénesis experimenta cambios cuyas causas no están determinadas. Nosotros estudiamos la influencia de ciertos factores estacionales y medioambientales en la neurogénesis del lagarto *Gallotia galloti* mantenido en cautividad y evaluamos si estas condiciones inciden en la tasa proliferativa. Analizamos dos grupos de lagartos: el primero se mantuvo en terrarios individuales externos durante un mes. Un día antes de ser sacrificados se les administró cuatro dosis de 100 mg/kg de BrdU cada dos horas. El segundo fue sometido al mismo tratamiento inmediatamente después de ser capturado en su medio natural. Los cerebros se procesaron y se contaron las células marcadas, encontrándose una disminución significativa de la tasa proliferativa en los animales del primer grupo con respecto a los del segundo. Esta disminución se localizó en tres áreas telencefálicas: córtex medial, septo y epéndimo ventromedial.

La disminución «selectiva» de la neurogénesis indica que la falta de estímulos sobre ciertas áreas provocada por la cautividad, incide negativamente en la neurogénesis. Dada la relación de estos centros con el sistema límbico y el control del movimiento, la ausencia de relación social y la limitación del área de desplazamiento durante la cautividad podría provocar una disminución de la actividad en esos centros.

P 146

GLÍA RADIAL Y SUBDIVISIÓN MESENCÉFALICA: ESTUDIO COMPARADO EN EMBRIONES DE LAGARTO Y POLLO

Trujillo CM^a, Delgado AC^a, Alonso MA^a, Botella M^a, Delgado FJ^a, Damas MC^b

^aDepartamento de Microbiología y Biología Celular. ^bDepartamento de Psicología Educativa, Evolutiva y Psicobiología. Universidad de La Laguna.

El estudio de la glía radial embrionaria del mesencéfalo del lagarto *Gallotia galloti* nos ha permitido elaborar un modelo de subdivisión mesencefálica basado en las características morfológicas y moleculares de estas células. Creemos que este modelo puede servir de base para interpretar el papel de la glía radial en la regionalización de cerebros estructuralmente más complejos. Con esta idea hemos estudiado la glía radial en el mesencéfalo de embrión de pollo, usando DiI y los anticuerpos H5 y 3CB2 (marcadores de glía radial). Constatamos que al igual que en lagarto, el tectum embrionario de pollo aparece dividido en cuatro áreas (*griseum tectalis*, techo óptico dorsal, *area intermediata* y *torus semicircularis*). El tegmento está caracterizado por largas prolongaciones de glía radial que

convergen ventralmente hacia la flexura céfalica. Una empalizada de glía radial separa el tecto del tegmento y marca el límite alar/basal a lo largo del eje A/P. Los límites mesencefálicos caudal y rostral están formados total (en el primer caso) o parcialmente (en el segundo) por glía radial fasciculada. Estos límites pueden definirse como la frontera más allá de la cual no pasan las prolongaciones de la glía radial mesencefálica. En la discusión se tienen en cuenta algunas de las particularidades del patrón en el pollo.

P 147

CORRIENTES SINÁPTICAS MINIATURADEPENDIENTES DE GABA_A EN NEURONAS PIRAMIDALES DE CORTEZA CEREBRAL DE RATÓN MUTANTE LIS1

Valdés-Sánchez ML^a, Martínez S, Geijo-Barrientos EC

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

El gen LIS1 es uno de los genes cuya mutación produce lisencefalia tipo I en el hombre. El ratón mutante estudiado presenta la delección del primer exón codificante del gen transcribiendo una proteína LIS1 mas corta y muestra alteraciones de la migración neuronal en la corteza cerebral.

Las corrientes sinápticas miniaturadependientes de receptores de GABA_A (mIPSCs) se registraron en neuronas piramidales identificadas visualmente mediante *whole-cell patch clamp* en rodajas de corteza frontal con soluciones intracelulares y extracelulares a concentraciones iguales de Cl⁻. La frecuencia de mIPSC fue menor en los animales LIS1 de 7 días posnatal (P7) (LIS1 0,55±0,16 Hz, n=25; *wild type* -WT- 2,39±1,81 Hz, n=39, p<0,05) y en LIS1 P30 (LIS1 1,18±0,27 Hz; n=14; WT 5,74±0,93 Hz, n=16, p<0,01). La amplitud de las mIPSC fue similar en animales LIS1 y WT de P7 y P30, pero la constante de tiempo promediada de la fase de caída de las mIPSC (obtenida del ajuste a dos exponenciales) fue mayor en animales LIS1 P7 (LIS1 7,32±0,75 ms, n=19; WT 5,50±0,33 ms, n=32, p<0,05) y en los animales LIS1 P30 (LIS1 4,17±0,27 ms; n=15; WT 3,14±0,32 ms, n=15, p<0,05).

Estos resultados sugieren que la transmisión sináptica inhibitoria está alterada en la corteza cerebral de ratones mutantes LIS1; esta alteración podría deberse, a la migración anómala de interneuronas gabérgicas de la corteza cerebral.

Trabajo realizado con los proyectos BFI2002-03467 y QLG3-2000-01625.

P 148

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE REELINA DURANTE EL DESARROLLO DEL ESTRIADO DE RATA

Dopeso-Reyes IG^a, López-Martín E^b, Rodríguez-Pallares J^b, Pérez-Costas E^a, Rodríguez MA^a, Labandeira-García JL^b, Caruncho HJ^a

^aDpto. Biología Celular e Ecología. ^bDpto. Ciencias Morfológicas. Universidade de Santiago de Compostela

La reelina es una proteína de la matriz extracelular que actúa en los procesos de posicionamiento, sinaptogénesis y plasticidad neural. Esta proteína aparece en parches en el estriado durante los estadios tardíos de desarrollo embrionario. Para aclarar el posible papel que puede desempeñar esta proteína durante la formación de los parches del estriado hemos llevado a cabo un estudio inmunohistoquímico en el que se analizó la expresión de reelina en el estriado en estadios prenatales y neonatal así como la correlación de la expresión de esta proteína con otros marcadores como GDNF, DARP-32, TH, GAD, y el receptor GABA_A.

Aunque en estadios anteriores encontramos células inmunorreactivas a reelina (reln-ir), es a partir del estadio de 15 días (E-15) y en el E-17 cuando observamos un aumento en el número de células reln-ir en el estriado en desarrollo. En E-15 el número de células reln-ir representa

aproximadamente un cuarto de las que son inmunorreactivas a GAD. En el estadio E-19 la mayoría de las células reln-ir se localizan en el borde del estriado, el resto forman parches en la capa del mato; la inmunorreactividad observada en estas zonas era difusa. En el P0 las células reln-ir siguen estando presentes en el borde del estriado y formando parches en la capa del manto, esta distribución coincide con la observada utilizando anticuerpos anti GDNF, DARP-32, TH, GAD y la subunidad beta 2/3, alfa 2 y alfa 5 del receptor GABA_A. La expresión temprana de reelina en el estriado en desarrollo sugiere que esta proteína podría estar implicada en la formación de los parches del estriado e incluso en la sinaptogénesis de las aferencias dopaminérgicas. Subvencionado por XUGA, DGESIC y Fundació Marató TV3.

P 149

INMUNORREACTIVIDAD PARA CALRETININA DURANTE EL DESARROLLO DE LA MÉDULA ESPINAL DE LA LAMPREA

Viloria A, Ruiz-Muñoz Y, Megías M

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Universidad de Vigo

P. marinus es una especie anádroma con un ciclo vida complejo: embrión, prolarva, larva, metamorfosis y adulto. Utilizando un anticuerpo policlonal para la calretinina (CR) se observan las primeras células positivas en el momento de la eclosión: células dorsales (Rohon-Bear) y motoneuronas. Dos días después aparecen células débilmente teñidas entre las células dorsales y las motoneuronas. Siete días tras la eclosión aparecen células ganglionares débilmente teñidas en la parte ventral de los ganglios espinales. Con el comienzo del periodo larvario (30 días tras la eclosión, 10 mm de longitud corporal) aparecen interneuronas en la sustancia gris que además son positivas para GABA, células que contactan con el líquido cefalorraquídeo en la parte ventral del canal central y numerosas células ganglionares. En larvas premetamórficas (100-150 mm de longitud corporal) la inmunorreactividad de las células dorsales disminuye y aumenta la de las interneuronas. Tras la metamorfosis las células dorsales son claramente negativas. En ejemplares adultos se observa un incremento en la intensidad de marcaje de las interneuronas y una disminución en las células ganglionares y en las motoneuronas. Por tanto, existe una correlación entre la variación de la inmunorreactividad para la CR en distintos tipos celulares de la médula espinal y las diferentes fases del ciclo de vida de la lamprea.

Financiado por CICYT (PM99-0072), Xunta de Galicia (PGIDT00 PXI30112PR) y Universidad de Vigo.

P 150

REGENERACIÓN DE AXONES SENSITIVOS Y MOTORES A TRAVÉS DE UN ELECTRODO REGENERATIVO. ESTUDIO ESTEREOLÓGICO CON TRAZADORES RETRÓGRADOS EN LA RATA

Castro J^a, Negro P^a, Lago N^b, Navarro X^b, Avendaño C^a

^a Dpto. Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. ^b Dept. Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Inst. de Neurociències, Univ. Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona

Se ha demostrado que las fibras de un nervio periférico seccionado regeneran a través de los microorificios de electrodos regenerativos (ER) interpuestos entre los cabos del nervio. No obstante, se desconoce la magnitud de esta regeneración y la posible selectividad de subtipos de fibras en este proceso. En el nervio ciático seccionado de ratas adultas hemos implantado unilateralmente un ER tras premarcado con un pequeño cristal de Diamidino Yellow aplicado al extremo del cabo proximal. Dos meses más tarde se seccionaron ambos ciáticos 10 mm distalmente al nivel de la primera sección, y se aplicó mediante un pocillo el trazador Fast Blue. Una semana después se perfundieron los animales, y se extrajeron sus médulas y los ganglios raquídeos de

niveles lumbosacros. Se seccionaron en congelación y se cuantificó el marcado celular con microscopía de fluorescencia, aplicando el método del fraccionador óptico con la ayuda del programa CAST-GRID. Un promedio de 18.500 neuronas fueron marcadas por el primer trazador en los ganglios L4-L6, con una mínima diferencia de lado (3% más en el lado control). El 50% de las neuronas del lado de implantación del ER captaron también el segundo trazador, mostrando así haber regenerado a través del chip. El número de motoneuronas marcadas por el primer trazador fue de 3.000 en el lado control y 2.500 en el lado de la implantación. Sólo el 5% de éstas captaron el segundo trazador, mostrando una baja capacidad de regeneración a través del chip. Financiado por los Proyectos IST-2001-34892 e IST-2001-35094 de la UE.

P 151

ESTUDIO MORFOFUNCIONAL DE LA CONEXIÓN DEL COLÍCULO INFERIOR AL COLÍCULO SUPERIOR DE LA RATA CONTROL Y ENUCLEADA NEONATALMENTE

Gerrikagoitia I^a, García del Caño G^a, Abenia JM^b, Sebastián JM^b, Martínez-Millán L^a

^a Departamento de Neurociencias, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. ^b Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Clínico Universitario de Zaragoza

Mediante la inyección del trazador anterógrado BDA en diferentes subdivisiones del colículo inferior (CI) se estudió su la conexión desde dicha estructura al colículo superior. Eran notables las diferencias en la densidad de fibras terminales, que era máxima tras las inyecciones que abarcaban las capas 1-2 de la corteza externa y la corteza dorsal del CI. Los plexos terminales cuya densidad aumentaba en sentido dorsoventral y rostrocaudal, se organizaban en 3 niveles: uno se extendía desde la parte ventral del estrato gris superficial (SGS) hasta el estrato gris intermedio, otro desde el estrato gris profundo al estrato blanco profundo y el tercero localizado en la sustancia gris periacueductal. Tras la estimulación auditiva mediante tonos de 1-4 Khz, se marcaron inmunohistoquímicamente, con anticuerpos contra el factor de transcripción c-fos, neuronas activadas presinápticamente, objetivándose una correlación entre su distribución y la de los campos terminales. La desaferenciación visual neonatal produjo un ascenso de numerosas fibras al SGS privado de estímulos visuales, así como un notable aumento en el número de células c-fos positivas en dicho estrato tras la estimulación auditiva, lo que sugiere una reacción plástica compensatoria mediante el reclutamiento, por parte del sistema auditivo, de neuronas del SGS que normalmente procesan información visual. Financiado por: Fondo de Investigaciones Sanitarias; PI020579.

P 152

VARIACIONES ENTRE AMBOS SEXOS EN LA EXPRESIÓN DE REELINA EN EL ÁREA PREÓPTICA E HIPOTÁLAMO DE RATA

Caruncho HJ, Dopeso-Reyes IG, Otero MJ, Pérez-Costas E, Rodríguez MA

Dpto. Biología Celular e Ecología, Universidade de Santiago de Compostela

La reelina es una glicoproteína de matriz extracelular. Durante el desarrollo su expresión es elevada en diversas áreas del encéfalo donde regula la migración neuronal. Esta proteína continúa presente en el encéfalo adulto donde se ha relacionado con la plasticidad sináptica. En este estudio nos hemos propuesto analizar las posibles diferencias entre ambos sexos en la expresión de reelina en dos áreas encefálicas que muestran un elevado grado de plasticidad sináptica como el área preóptica e hipotálamo de rata, mediante técnicas inmunohistoquímicas. En los machos hemos observado numerosas células reelina inmunorreactivas en el área preóptica (área periventricular, medial y lateral) e hipotálamo anterior (núcleo paraventricular y región supraquiasmática); aunque

estas agrupaciones siguen estando presentes en las hembras, el número de células reelina inmunorreactivas disminuye con respecto al observado en los machos. Otra diferencia entre ambos sexos la hemos encontrado en la región del arcuado, donde los machos presentan células reelina inmunorreactivas, sin embargo, éstas están prácticamente ausentes en las hembras. En la región mamilar de ambos sexos no hemos detectado inmunoreactividad a la reelina. Estos resultados indican variaciones en la expresión de reelina entre ambos sexos a nivel del hipotálamo y área preóptica, las cuales podrían estar relacionadas con diferencias hormonales y fisiológicas asociadas al sexo.

Financiación: proyecto de la Fundació Marató TV3.

P 153

PAPEL DE LAS METALOTIONEÍNAS EN LA REGENERACIÓN DEL NERVI PERIFÉRICO

Lago N^a, Ceballos D^a, Molinero A^b, Hidalgo J^b, Verdú E^a, Navarro X^a

^a Grupo de Neuroplasticidad y Regeneración, Unidad de Fisiología Médica.

^b Unidad de Fisiología Animal, Instituto de Neurociencias y Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universitat Autònoma de Barcelona

Las metalotioneínas (MT) son unas proteínas neuroprotectoras frente a la toxicidad por metales, estrés oxidativo, etc. Se ha evaluado el posible papel de estas proteínas sobre la regeneración periférica después del aplastamiento del nervio ciático. Se han utilizado ratones *knock-out* (KO) para las proteínas MT-1+2 (MT-1+2KO) y para la MT-3 (MT-3KO) junto con sus controles genéticos (129/Sv). Tras lesionar el nervio ciático, se evaluó la tasa de regeneración axonal a los 2, 4 y 7 días, mediante el *pinch test*, y a los 14 días se valoró la latencia y la amplitud del potencial de acción compuesto de los músculos plantar y gastrocnemio, y del potencial de acción compuesto de los nervios tibial y digital. Se ha realizado la descripción morfológica y el recuento del número de fibras mielínicas en degeneración y regeneración a los 2, 4, 7 y 14 días así como el análisis de la reinervación a nivel de las almohadillas por técnicas inmunohistoquímicas.

Los resultados muestran diferencias en la tasa de regeneración en los MT-3KO, respecto a los otros 2 grupos, siendo más elevada a los 2 y a los 14 días, donde sólo este grupo presenta potenciales de acción nervioso en el nervio digital. Este resultado queda reforzado por los estudios morfológicos donde el número de fibras mielínicas regeneradas es significativamente más elevado en este grupo. Estos resultados sugieren que la MT-3 puede jugar un papel importante en la regeneración axonal después de una lesión del nervio periférico.

P 154

EFFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA SINAPTÓGENESIS EN NEURONAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO

Gratacòs E, Gual A, Morales M

Laboratorio de Neurofisiología, Facultad de Medicina,

Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques

Agustí Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona

El etanol es una molécula polar de pequeño tamaño que puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) por difusión simple. Varios estudios de los efectos del etanol sobre distintos tipos celulares, parecen indicar que repercute sobre el citoesqueleto de actina, induciendo una despolimerización de la actina a través de la vía de señalización de Rho. Se ha descrito que mutaciones que alteren esta vía de senyalización, llevan a una conectividad anormal y a déficit cognitivos en humanos.

La actina es uno de los principales componentes del citoesqueleto de las neuronas y participa en procesos de crecimiento y de sinaptogénesis. En el presente estudio se pretenden estudiar los efectos del etanol sobre la morfología y la capacidad de formación de nuevas sinapsis de

neuronas de hipocampo de rata en cultivo sometidas a los efectos del etanol en distintos momentos del desarrollo neuronal.

El estudio se ha dividido en tres periodos: (1) Período temprano: exposición a etanol desde el día 2 hasta el día 8 del cultivo *in vitro* para observar cambios en la morfología de los conos de crecimiento y en la diferenciación y desarrollo neurítico. (2) Período intermedio o de sinaptogénesis: exposición a etanol desde el día 4 hasta el 16 para estudiar cambios en la sinaptogénesis. (3) Período de maduración: exposición a etanol desde el día 14 hasta el 22 del cultivo para cuantificar los posibles cambios en la morfología y densidad de las espinas dendríticas.

P 155

BONE MORPHOGENETIC PROTEINS REGULATE LA ACTIVIDAD DE SONIC HEDGEHOG EN EL DESARROLLO DEL CEREBELO

Rios I^a, Álvarez R^b, Pons S^b, Martí E^a

^a Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CID-CSIC). ^b Instituto

de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IDIBAPS-CSIC). Barcelona

Durante el desarrollo del cerebelo *Sonic hedgehog* (Shh) se expresa en las neuronas de Purkinje y es el responsable directo de la expansión clonal de precursores de neuronas granulares, que ocurre en la capa germinativa externa (EGL). Esta proliferación inducida por Shh está regulada por glicoproteínas de la matriz extracelular, sin embargo, para que las neuronas granulares completen su programa de diferenciación la actividad de Shh debe ser totalmente inhibida. En el presente trabajo hemos iniciado la búsqueda de una señal o grupo de señales capaces de antagonizar la señalización de Shh y por lo tanto capaces de permitir la diferenciación de neuronas granulares. Como interés añadido al proceso de desarrollo normal del cerebelo, está el control de la formación de tumores cerebrales (meduloblastomas), directamente inducidos por la señalización de Shh.

Las *bone morphogenetic proteins* (BMPs), se expresan durante el desarrollo del cerebelo. BMP2 y BMP4 se expresan en la EGL donde la proliferación de precursores granulares es máxima. La expresión de BMP2 posteriormente se inicia también en la capa granular Interna donde se localizan las neuronas granulares diferenciadas. En cultivos primarios de precursores de granulares, BM2 y BMP4 son capaces de inhibir totalmente la proliferación inducida por Shh, así permitiendo la diferenciación de neuronas granulares. BMP7 sin embargo se coexpresa con Shh en las neuronas de Purkinje, y en cultivos primarios tiene actividad sinérgica con Shh. Utilizando un sistema semi-*in vivo* de cultivos de rodajas, en donde hemos implantado *beads* de agarosa recubiertos con las distintas proteínas, los resultados obtenidos confirman el antagonismo de BMP2/BMP4 sobre la proliferación de precursores de granulares.

P 156**ESPECIFICACIÓN DE SUBTIPOS DE MOTONEURONAS ESPINALES: UN NUEVO PAPEL PARA SONIC HEDGEHOG**

Cayuso J, Martí E

Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CID-CSIC). Barcelona

El papel del morfógeno *Sonic hedgehog* (Shh) en la determinación del eje dorso-ventral del tubo neural de vertebrados es bien conocido. Shh se expresa en la notocorda y en la placa del suelo. Después de distintas modificaciones postranscripcionales se secreta y difunde hacia regiones dorsales especificando, de manera dependiente de concentración, distintas subpoblaciones de precursores (p0, pMN, p1, p2, p3) que darán lugar a las motoneuronas (MN) y a diferentes subtipos de interneuronas (V0, V1, V2, V3). Los distintos tipos de motoneuronas espinales (MN), generados todos a partir de un precursor común (pMN) se agrupan en columnas a lo largo del eje rostrocaudal y se distinguen por su posición, por la expresión de distintos genes marcadores y por la trayectoria de sus axones. Mientras la columna medial de MNs (MMC) inerva la musculatura axial, la columna lateral (LMC) proyecta sus axones a los músculos de las extremidades. La LMC, está dividida además en la región lateral (LMCL) que inerva la musculatura dorsal de la extremidad, y la región medial (LMCM) que proyecta hacia músculos ventrales.

En este trabajo describimos la expresión de Shh en poblaciones posmitóticas de MNs de la LMCM. Esta expresión sugiere un posible nuevo papel de Shh en la determinación de un subtipo específico de MNs espinales. Para estudiar esta posible actividad hemos utilizado elementos de la vía de señalización de Shh; un dominante negativo de Pka (activador de la vía) y un mutante del receptor Patched (inhibidor de la vía), que han sido introducidos *in vivo* en embriones de pollo, mediante electroporación *in ovo*. La activación o inhibición constitutiva de la vía de señalización de Shh específicamente en estas poblaciones de MNs nos permitirá analizar de forma directa su función.

P 157**MODULACIÓN DE LA PLASTICIDAD ESTRUCTURAL EN EL SISTEMA LÍMBICO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO**

Nàcher J, Varea E, Molowny A, Ponsoda X, López-García C

Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia, Universitat de València

La expresión de moléculas relacionadas con la plasticidad estructural persiste en determinadas regiones del cerebro adulto, especialmente en el sistema límbico, donde se ha relacionado con el aprendizaje y la memoria. Durante el envejecimiento del hipocampo, la expresión de moléculas como la forma polisializada de NCAM (PSA-NCAM), la doblecortina (DCX) o la proteína mediadora de la respuesta a la colapsina-4 (CRMP-4) decrece considerablemente. Para estudiar cómo afecta el envejecimiento a la plasticidad estructural del sistema límbico, hemos estudiado la expresión de estas moléculas en el hipocampo, la corteza piriforme y la amígdala de la rata. El hipocampo de ratas viejas todavía mantiene neuronas granulares DCX, PSA-NCAM y CRMP-4 inmunoreactivas, probablemente de nueva generación. No obstante, durante el envejecimiento también se detectan células que expresan DCX en regiones del cerebro donde no ha sido descrita neurogénesis adulta, como la corteza piriforme y, sorprendentemente, la amígdala. Tratamientos que mejoran las capacidades cognitivas de las ratas durante el envejecimiento, como la administración de L-deprenil, incrementan significativamente la expresión de DCX en el hipocampo y la corteza piriforme de ratas viejas. Resultados similares se observan en la expresión de PSA-NCAM o de CRMP-4. Estos resultados apoyan y expanden la idea de que la plasticidad estructural persiste y puede ser incrementada durante el envejecimiento cerebral.

P 158**ALTERACIÓN EN EL PATRÓN DE RESPUESTA DE $[Ca^{2+}]_i$ EN LA NEOCORTEZA DE EMBRIONES HIPOTIROIDEOS**

Cuevas E, Soria JM, Valdeolmillos M, Berbel P

Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC. Alicante

Las hormonas tiroideas maternas son fundamentales para el desarrollo del cerebro y su carencia produce una alteración en la migración neuronal durante la corticogénesis en feto. Los mecanismos relacionados con la señalización mediada por cambios de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en las neuronas migratorias se han estudiado en respuesta a diferentes neurotransmisores. Los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en una zona marginal (MM), intermedia (MI) y ventricular (MV) de ($150 \times 50 \mu m$) de la neocorteza lateral de ratas Wistar normales e hipotiroideas (tratadas con metimazol), a edad embrionaria (E) 15-16 y 19-20, inducidos por kainato ($50 \mu M$) y muscimol ($50 \mu M$) se midieron en rodajas coronales de $300 \mu m$. Las rodajas se incubaron 1-2 días en medio neurobasal y previo al registro, con Fura-2 AM ($50 \mu M$). En embriones normales (E15-16), se observaron cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ mayores en la MM, con respecto a la MI y a la MV. En los embriones hipotiroideos, el patrón de respuesta fue mayor en la MM y menor en la MI y MV, comparado con los embriones normales. Sin embargo, a E19-20, no se observaron diferencias entre ambos y la respuesta parecida fue en las tres zonas de muestreo. Estos resultados sugieren un patrón de maduración en la respuesta a neurotransmisores en la neocorteza, asimismo, un retraso en la expresión o función de los receptores para neurotransmisores en las neuronas de los embriones hipotiroideos. Financiado por SAF2000-0152-C01/C02 (PB/MV) y CONACYT 124841 (EC).

P 159**PROTEÍNAS SMAD EN EL ESTABLECIMIENTO DEL PATRÓN DORSOVENTRAL DEL TUBO NEURAL**

García-Campmany L, Martí E

Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CID-CSIC). Barcelona

La médula espinal es la parte anatómicamente más sencilla del sistema nervioso central (SNC); la mitad dorsal contiene neuronas que integran información sensorial periférica y la mitad ventral contiene neuronas responsables del control motor. Esta organización adulta refleja el origen embrionario de los distintos tipos neuronales; en la parte dorsal se generan seis clases de interneuronas (dl1-dl6) implicadas en el control sensorial, mientras que en la parte ventral se generan cuatro tipos de interneuronas ventrales (V0-V3) además de las motoneuronas espinales (MN). Esta organización del tubo neural se adquiere durante el desarrollo embrionario mediante las acciones opuestas de las *bone morphogenetic proteins* (BMPs) y de *Sonic hedgehog* (Shh) secretados desde centros organizadores dorsales y ventrales respectivamente. BMPs y otros miembros de la superfamilia de los *transforming growth factors b* (TGFB) se expresan en el ectodermo no neural, en la línea media dorsal y en el tercio dorsal del tubo respectivamente, induciendo la adquisición de fenotipos dorsales.

En este trabajo hemos iniciado un estudio de la expresión de proteínas Smad, los efectores transcripcionales de la vía de TGFB/BMPs, en el tubo neural de embriones de pollo. En particular hemos analizado Smad1-5-8 como activadores de la transcripción dependiente de BMPs, Smad2-3 como activadores dependientes de TGFB, y Smad6-7 que son inhibidores de ambas vías. Basándonos en los datos de expresión obtenidos, estudiamos la actividad de estos factores de transcripción *in vivo*, mediante la electroporación *in ovo* de formas nativas o mutadas de los mismos.

P 160**LA EMINENCIA GANGLIONAR MEDIAL PRODUCE NEURONAS QUE MIGRAN TANGENCIALMENTE A LOS PALIOS LATERAL Y VENTRAL**

García-López M, Legaz I, Medina L

Departamento de Anatomía Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. Murcia

La eminencia ganglionar medial (EGM) es una fuente de interneuronas gabérgicas hacia la corteza cerebral y el hipocampo. Los palios lateral y ventral (PL,PV), que incluyen el núcleo endopiriforme y el complejo basolateral de la amígdala (BLC), también contienen interneuronas gabérgicas. En el BLC, existen varios subtipos de interneuronas gabérgicas que contienen neuropéptido Y (NPY), somatostatina (SS) o VIP (Muller et al., 2003). Nuestro objetivo ha sido analizar si, como en la corteza y el hipocampo, parte de las interneuronas de PL y PV se originan en la EGM. Para ello, primero hemos analizado el desarrollo de neuronas inmunorreactivas para GABA, NPY o SS en el claustró, núcleo endopiriforme y BLC. Desde estadios embrionarios tempranos, en estos centros existen bastantes neuroblastos migratorios y neuronas inmaduras inmunorreactivas para GABA, NPY o SS. Para analizar el posible origen de parte de estas células en la EGM, hemos realizado cultivos organotípicos de rodajas de telencéfalo embrionario de ratón, y hemos aplicado el marcador fluorescente CMTMR en la EGM. A las 48 horas de incubación, de forma constante, hemos observado un pequeño número de neuroblastos migratorios o neuronas inmaduras desplazadas tangencialmente desde la EGM hacia el núcleo endopiriforme y BLC. En el futuro pensamos usar inmunofluorescencia para saber si algunas de las células desplazadas desde el EGM a PL y PV son peptidérgicas.

Financiación: FIS 01/0057/02 y BFI2000-C1359-C02-02 a L.M.

P 161**MIGRACIÓN TANGENCIAL DE NEURONAS DESDE LA EMINENCIA GANGLIONAR LATERAL A LOS PALIOS LATERAL Y VENTRAL**

Legaz I, García-López M, Medina L

Departamento de Anatomía Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. Murcia

La eminencia ganglionar lateral (EGL) es una fuente de interneuronas gabérgicas hacia la corteza cerebral y el hipocampo. Los palios lateral y ventral, que incluyen el claustró, el núcleo endopiriforme y el complejo basolateral de la amígdala (BLC), también contienen una subpoblación de interneuronas gabérgicas. En el BLC, el 55% de estas interneuronas contienen calbindina (CB) (Muller et al., 2003). Nuestro objetivo ha sido analizar si, como en la corteza, parte de las interneuronas de los palios lateral y ventral se originan en la EGL. Para ello, primero hemos analizado el desarrollo de neuronas inmunorreactivas para GABA o CB en el claustró, núcleo endopiriforme y BLC. Desde estadios embrionarios tempranos, en estos centros existen bastantes neuroblastos migratorios y neuronas inmaduras inmunorreactivas para GABA o CB. Para analizar el posible origen de parte de estas células en la EGL, hemos realizado cultivos organotípicos de rodajas de telencéfalo embrionario de ratón, y hemos aplicado el marcador fluorescente CMTMR en distintos niveles rostrocaudales de la EGL. Tras 48 horas de incubación, de forma constante, hemos observado un pequeño número de neuronas inmaduras marcadas con CMTMR desplazadas tangencialmente desde la EGL hacia distintas partes de los palios lateral y ventral, incluyendo el claustró y el núcleo endopiriforme. Algunas de ellas eran inmunorreactivas para CB.

Proyectos BFI2000-C1359-C02-02 y FIS 01/0057/02 a L.M. y beca FP2000-5943 a I.L.

P 162**REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS FORMADORAS DE NEUROESFERAS Y DE PRECURSORES NEURONALES Y GLIALES POR ÓXIDO NÍTRICO**

Torroglosa A, Murillo-Carretero M, Matarredona ER, Estrada C

Área de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Cádiz

El óxido nítrico (NO) inhibe la proliferación de los precursores neuronales de la zona subventricular (SVZ) en el ratón adulto. Para analizar si se trata de un efecto directo sobre dichos precursores, se obtuvieron células de la SVZ de ratones posnatales (P7) y se mantuvieron en cultivos de neuroesferas (NF) en presencia de EGF. La adición del donante de NO, DETA-NO, a los cultivos disminuyó el número de NF formadas así como su tamaño medio. Las células de NF en cultivo expresaron las isoformas de NO sintasa nNOS e iNOS. Cuando se cultivaron las NF en presencia de L-NAME, inhibidor no selectivo de la actividad NOS, aumentó tanto el número como el tamaño de las NF. El tratamiento con 7-nitroindazol, inhibidor de nNOS, o con 1400w, inhibidor de la isoforma inducible, produjo efectos semejantes, aunque menos marcados, sugiriendo que ambas isoformas están activas en estas células. Cuando las células que formaban las NF se disgregaron y se sembraron sobre un sustrato de poliornitina, las células adheridas continuaban proliferando en presencia de EGF e insulina y comenzaban a diferenciarse. En estas condiciones, la adición de NO inhibió la densidad de células en el cultivo, el porcentaje de células que incorporaban BrdU, y la transfosforilación del receptor de EGF, cuando era activado por su ligando. Las células adheridas también expresaron las dos isoformas de NOS y aumentaron su proliferación cuando se inhibió esta actividad enzimática.

Financiado por FIS00/1080 y SAF2002-2131.

P 163**BMP7 ACTÚA EN SUCESIVAS ETAPAS DEL DESARROLLO DEL OJO: EVIDENCIAS SOBRE SU IMPLICACIÓN EN LA FORMACIÓN DE LA FISURA ÓPTICA**

Morcillo J, Martínez-Morales JR, Trousse F, Bovolenta P

Departamento de Neurobiología del Desarrollo, Instituto Cajal, CSIC

La invaginación de la vesícula óptica y su especificación en retina neural (RN), epitelio pigmentado (EP) y tallo óptico (TO) requiere de la actividad de distintos factores extracelulares, incluyendo las BMPs. En ratones nulos para Bmp7 el desarrollo del ojo se detiene muy temprano, causando microftalmia o anoftalmia (Dudley et al., 1995). Nosotros nos hemos planteado la hipótesis de que la actividad BMP7 sea necesaria para especificar los distintos territorios oculares. Así, hemos analizado la expresión de genes característicos de RN (Six3, Chx10), EP (Otx2, Mitf) y TO (Vax1, Pax2, RALDH3) en ratones Bmp7^{-/-}, cedidos por la Dra. E. Robertson. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad BMP7 es necesaria para la segregación de la RN y el EP en el 50% de los embriones Bmp7^{-/-}. Los restantes homocigotos nulos carecen de fisura óptica y arteria hialoidea, deficiencia que se correlaciona con una menor proliferación de la RN y una reducción de las células del disco óptico que expresan Pax2 y Netrin1. Tal vez como resultado de estas alteraciones, los axones de las células ganglionares son incapaces de abandonar la copa óptica con una consecuente aplasia o hipoplasia del nervio óptico, donde también el número de células gliales aparece reducido. Estos datos sugieren que BMP7 actúa en distintas etapas del desarrollo ocular incluyendo la regionalización de la vesícula óptica, la morfogénesis de la fisura óptica y, posiblemente la generación de la glía del nervio óptico.

P 164**DISTRIBUCIÓN DE TIROSINA HIDROXILASA DURANTE LA ONTOGENIA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL PEZ CEBRA**

Arévalo R, Arenzana FJ, Porteros A, Clemente D, Aijón J
Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Dpto. de Biología Celular y Patología, Universidad de Salamanca

La detección de tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la biosíntesis de catecolaminas, se emplea para analizar la distribución de elementos catecolaminérgicos en el sistema nervioso central (SNC). En el pez cebra adulto se observan, además de neuropilo teñido, células marcadas distribuidas a lo largo de toda su extensión. Hemos analizado la evolución de la inmunorreactividad para TH durante el desarrollo del SNC del pez cebra.

La TH se expresa por primera vez a las 24 horas posfecundación (hpf) en la placa basal del prosencéfalo. A las 48 hpf esta población se segrega en dos. La más dorsal constituirá la parte caudal del tubérculo posterior, y la más ventral originará el componente catecolaminérgico del hipotálamo. En ese mismo estadio se observan células positivas a TH en el primordio del bulbo olfatorio, área preóptica y en el mielencéfalo. A las 60 hpf aparecen células marcadas en el pretectum, tálamo ventral y tubérculo posterior. Tras la eclosión, son positivas las células interplexiformes de la retina, aumentando la densidad de los elementos marcados en el resto del SNC. A las 96 hpf, aparecen células teñidas en la glándula pineal junto con neuropilo en el techo óptico rostral. A las 108 hpf se observa marcaje en los hemisferios telencefálicos y en fibras del cerebelo. El único cambio a partir de este estadio es la desaparición del marcaje de las células de la glándula pineal.

Trabajo cofinanciado por el FISS (PI021730) y la Junta de Castilla y León.

P 165**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LA α -SINUCLEÍNA DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO**

Cano-Jaimez M, Milán-Sánchez M, Fariñas I
Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. Burjassot, Valencia

La α -sinucleína (α SYN) se expresa en la mayoría de neuronas y se encuentra enriquecida en terminales sinápticos. Aunque la función normal de la α SYN es desconocida se sabe que se acumula anormalmente, formando inclusiones intracelulares características (cuerpos de Lewy), en la enfermedad de Parkinson. Para tratar de elucidar el papel normal de la α SYN hemos estudiado su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario. A diferencia de la situación en el adulto, la expresión de α SYN en el cerebro prenatal se restringe desde estadios muy tempranos (E10) a poblaciones neuronales que expresan tirosina hidroxilasa. Curiosamente, también hay expresión de α SYN en ganglios del sistema nervioso periférico, sensoriales y simpáticos, que es variable a lo largo de la embriogénesis. Debido a la marcada expresión de la α SYN en el ganglio nodoso y en el ganglio cervical superior (SCG) hemos analizado algunos parámetros del desarrollo de estos ganglios. Hemos analizado la proliferación, neurogénesis y supervivencia neuronal *in vivo*, sin encontrar diferencias entre genotipos. Sin embargo, estudios *in vitro* de dependencia trófica muestran que neuronas disociadas del ganglio nodoso de embriones mutantes nulos para α SYN resisten mejor la privación trófica que neuronas aisladas de embriones de genotipo salvaje. Estamos analizando los posibles mecanismos implicados en esta supervivencia diferencial y el posible papel de la α SYN en el desarrollo de la morfología neuronal.

P 166**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE IRS-2 EN LA PROLIFERACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y SUPERVIVENCIA CELULARES EN EL SISTEMA NERVIOSO**

Chirivella L^a, Kirstein M^a, Valdés T^a, Burks D^b, Fariñas I^a
^aUnidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia. Burjassot, Valencia. ^bDepartamento de Biología Celular y Patología, Universidad de Salamanca. Salamanca

El factor de crecimiento IGF-I, relacionado estructuralmente con la insulina, interviene en el desarrollo embrionario y postnatal del sistema nervioso central de mamíferos, así como de otras estructuras como el páncreas, hueso, retina, músculo y tejido adiposo. El IGF-I ejerce su acción a través de la cascada de señalización de la insulina/IGF, un paso esencial en su activación es la fosforilación de miembros de la familia IRS (*insulin receptor substrate*). Hasta hoy se han descrito 4 miembros de esta familia, de los cuales el más ubicuo es IRS-2. Para estudiar el posible papel de IRS-2 *in vivo* en la proliferación, supervivencia y diferenciación de células neurales hemos analizado distintos aspectos del desarrollo del sistema nervioso de ratones mutantes nulos para IRS-2 (*Irs2*^{-/-}). En ratones neonatos deficientes en IRS-2 se observan déficits específicos en el número de neuronas de ciertas estructuras del sistema sensorial primario que indican un efecto selectivo de esta vía de señalización en la supervivencia neuronal. Concretamente en el ganglio nodoso, un ganglio sensorial visceral que inerva distintos órganos del tórax y abdomen, se produce una pérdida de neuronas de aproximadamente un 25% en ausencia de IRS-2. Además, para estudiar el posible efecto sobre la proliferación y diferenciación de progenitores neurales hemos estudiado el comportamiento de progenitores multipotentes aislados a partir de cerebros embrionarios y de zonas neurogénicas posnatales.

P 167**ESTUDIO *IN VIVO* DEL CONTROL DEL NÚMERO DE NEURONAS EN EL DESARROLLO TEMPRANO DE LOS GANGLIOS SENSORIALES ESPINALES POR NT-3 Y LA FAMILIA CIP/KIP**

Bellmunt E, Fariñas I
Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia. Burjassot, Valencia

Los mutantes para distintos miembros de la familia de las neurotrofinas sufren pérdidas de neuronas en los ganglios sensoriales espinales (DRG) desde etapas tempranas del desarrollo. Existe cierta controversia en cuanto al fenotipo temprano del mutante de NT-3. Se ha postulado que la muerte neuronal podía producir una diferenciación prematura de los precursores en el ganglio que contribuiría a la reducción del número final de neuronas y que este efecto podría ser indirecto. Otros trabajos han sugerido que en ausencia de NT-3, se producen cambios en la expresión de moléculas de ciclo celular y que las neuronas generadas intentan reentrar en el ciclo proliferativo, lo cual les provoca la muerte. Para profundizar en estos aspectos, hemos estudiado la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKI) de la familia Cip/Kip en los DRGs en distintos estadios del desarrollo, tanto en condiciones normales como en condiciones de falta de NT-3 y hemos analizado el fenotipo de ratones mutantes nulos para p21 y p27, así como de los mutantes dobles nulos de NT-3 y cada CKI, para ver su participación en la formación de estas estructuras. Para ver si el efecto de la falta de NT-3 sobre los precursores está, en realidad, mediado por la muerte neuronal también se han analizado mutantes dobles nulos para Bax y NT-3, en los que la ausencia de la molécula proapoptótica, produce el rescate de la muerte neuronal y es viable estudiar otras posibles funciones de NT-3.

P 168**CAMBIOS DIFERENCIALES EN EL DESARROLLO DE LA INERVACIÓN INTRAMUSCULAR INDUCIDOS POR PARÁLISIS DE LA ACTIVIDAD NEUROMUSCULAR CON CURARE O POR LESIÓN NEURONAL CON NMDA**

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

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida

Dado que la actividad neuromuscular durante el desarrollo es importante en la determinación tanto en el número de MNs como del patrón de inervación motora periférica y del número de sinapsis neuromusculares, hemos determinado los cambios en estos parámetros en embriones de pollo después de inducir la parálisis con NMDA o bien con curare. Los resultados han confirmado que el tratamiento con curare incrementa el número de MNs en la médula espinal así como el número de ramificaciones nerviosas intramusculares y de sinapsis visualizadas por la bungarotoxina o con anticuerpos específicos. Además, la longitud de la membrana postsináptica es inferior a la de los controles. Por otra parte, el tratamiento con NMDA incrementa también el número de MNs y produce aumento en la complejidad y en el número de las ramas nerviosas intramusculares que siguen, no obstante, un patrón distinto del observado con curare. La longitud de las sinapsis neuromusculares se incrementa muy notablemente por el tratamiento con NMDA. Concomitantemente, el contenido en CGRP del soma de las MNs se halla muy incrementado en los embriones tratados con NMDA pero no en aquellos tratados con curare. Se interpretan los resultados en función de los distintos patrones de actividad eléctrica neuromuscular inducidos por los tratamientos. Además, se discute la posible correlación entre los cambios plásticos detectados en el sistema neuromuscular después del tratamiento excitotóxico subletal con NMDA y aquellos observados en la ELA humana o experimental.

P 169**EFFECTOS DE LA AUTOADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO**Del Olmo N^a, Miguens M^a, Torres I^a, Solís JM^b, Ambrosio E^a^aDepartamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, UNED. Madrid.^bServicio de Neurobiología, Departamento de Investigación, Hospital Ramón y Cajal. Madrid

Las adaptaciones neurales implicadas en el inicio y el mantenimiento del consumo de drogas de abuso son objeto de un gran número de investigaciones en la actualidad. Se ha sugerido que los mecanismos que subyacen a fenómenos como el aprendizaje y la memoria pueden ser modificados por la adicción a las drogas. Existen estudios recientes que relacionan determinadas drogas con la potenciación de larga duración o LTP, que actualmente se considera el sustrato fisiológico del aprendizaje y la memoria. La LTP de larga duración es dependiente de la transmisión dopaminérgica en el hipocampo a través de receptores del tipo D1/D5, y la cocaína al inhibir el transporte de dopamina puede provocar adaptaciones neuronales en las neuronas dopaminérgicas. Este trabajo trata de discernir si la autoadministración de cocaína influye sobre la plasticidad sináptica en el hipocampo, y su posible implicación en fenómenos de aprendizaje y memoria.

Los animales se autoadministraron cocaína durante tres semanas y tras este período, se sacrificaron y se obtuvieron rodajas de sus hipocampos en las que se realizaron los experimentos electrofisiológicos para cuantificar la LTP.

Nuestros resultados preliminares parecen indicar que existen diferencias en el grado de potenciación obtenido tras la estimulación de alta frecuencia (100 Hz/1 s) necesaria para generar la LTP de larga duración en animales que se han autoadministrado cocaína respecto a los animales control. Estos datos sugieren que la autoadministración de cocaína puede modular los fenómenos plásticos que se dan en el sistema

nervioso central y apuntan la importancia de los fenómenos de aprendizaje en las recaídas en la adicción a la cocaína.

Investigación financiada por el Plan Nacional sobre Drogas (2000-2003).

P 170**DEVELOPMENTAL DEFECTS IN CEREBRAL CORTEX AND OLFACTORY BULB DEMONSTRATE A CRUCIAL ROLE OF Vax1 DURING THE DEVELOPMENT OF THE TELENCEPHALON**Soria JM^a, Tagliatela P^b, Bertuzzi S^a^aDulbecco Telethon Institute at CNR-ITB. Segrate (MI), Italy.^bNewron Pharmaceuticals. Gerezano (MI), Italy

Two different types of cellular migration can be distinguished in the developing telencephalon: (1) a radial migration pathway, followed by projecting neurons in the neocortex, which are generated from precursor cells located in the underlying ventricular zone; and (2) a tangential migration pathway, followed by interneurons that populate the cortex and the olfactory bulb, migrating across rather long distances.

During development, tangentially migrating cells originate in the ventricular zone of the basal telencephalon. This area contains two distinct progenitor domains, the lateral and the medial ganglionic eminences (LGE and MGE), generating the striatum and the globus pallidus, respectively.

We present data indicating that mice lacking the homeobox gene Vax1 show a developmental defect affecting the basal ganglia, which seem strikingly expanded and poorly differentiated. As a consequence, Vax1 $-/-$ mice show a reduced stream of neural stem cells that reach the olfactory bulb, following the tangential trajectory known as rostral migratory stream. We also observe a strong reduction in the number of GABAergic interneurons present in the cerebral cortex.

These findings indicate that, in the absence of Vax1, the progenitors of tangentially migrating neurons do not develop properly, highlighting an important role of Vax1 in the determination processes of tangentially migrating interneurons.

P 171**BDNF INDUCE UN PROCESO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS EMBRIONARIAS CORTICALES**

Cambray S, Aldea M, Gallego C

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida. Lleida

El desarrollo del sistema nervioso durante la embriogénesis esta regulado por la interacción entre programas endógenos de expresión génica y señales externas proporcionadas por hormonas y factores de crecimiento. En este proceso juegan un papel clave las neurotrofinas, responsables de la supervivencia y diferenciación de poblaciones específicas de neuronas durante el desarrollo embrionario, y de su mantenimiento funcional en el adulto. Uno de los procesos que tiene lugar durante la diferenciación neuronal es la salida del ciclo celular como consecuencia de la alteración de la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular. Los trabajos relacionados con este estudio se iniciaron hace un año teniendo como objetivo principal profundizar en los mecanismos moleculares que regulan la coordinación entre proliferación y diferenciación. Utilizando cultivos primarios de precursores neuronales E14 de ratón hemos puesto a punto un modelo de diferenciación dependiente de BDNF. Tratando dicho cultivo con bFGF conseguimos que las células se mantengan proliferando en un estado indiferenciado como lo demuestra la incorporación de BrdU y la presencia de nestina. Por el contrario cuando las células se tratan con BDNF se observa una elevada neuritogénesis, expresión de β -III-tubulina siendo la incorporación de BrdU muy baja. En la actualidad estamos

analizando la expresión de algunas de las principales proteínas implicadas en el proceso de diferenciación neuronal y proliferación.

P 172

ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA ADULTA Y SU REGULACIÓN POR ACTIVIDAD SINÁPTICA

Fontana X, Mingorance A, Soriano E, Del Río JA
Neurobiología del Desarrollo y Regeneración, Parque Científico de Barcelona-Instituto de Investigación Biomédica de Barcelona, Universidad de Barcelona, Barcelona

Diversos estudios han demostrado la existencia de dos áreas de proliferación adulta en el SNC: la zona subventricular y la región subgranular del giro dentado. Para ambas regiones se ha analizado extensamente la potencialidad de las células proliferantes presentes en estas zonas gracias a su aislamiento con factores tróficos y su caracterización *in vitro* e *in vivo*. Concretamente, se ha descrito diversos factores que modulan la proliferación de los precursores neuronales del giro dentado. Entre ellos, se ha descrito que la entrada de información desde el córtex entorrinal constituye en sí misma un componente represor para su proliferación si bien la estimulación electrolítica de la conexión entorrinohipocámpica incrementa su tasa proliferativa. Con el objetivo de caracterizar las células con capacidad mitótica de la formación hipocámpica adulta, hemos desarrollado un conjunto de experimentos de marcaje con 5'-bromodeoxiuridina (BrdU) en los que hemos caracterizado el fenotipo y maduración temporal de las células proliferantes. Además, hemos aislado células proliferantes en neuroesferas a partir del córtex entorrinal e hipocampo posnatal-adulto y hemos estudiado su potencialidad *in vivo* e *in vitro*. Por último, hemos analizado las respuestas celulares del conjunto de células proliferantes del hipocampo bajo lesiones unilaterales de la conexión entorrinohipocámpica o de la fimbria-fórnix. Nuestros resultados indican que existen tres grandes grupos de células proliferantes en la formación hipocámpica: las células de la pared ventricular/sustancia blanca, las células del estrato subgranular y células dispersas por el parénquima nervioso. Las células presentes en la sustancia blanca derivada de la pared ventricular tienen la capacidad de formar neuroesferas en el córtex entorrinal adulto dando lugar a neuronas y glia tras su trasplante en el giro dentado. Por el contrario, las células dispersas en el parénquima neural (células satélite) corresponden a progenitores de oligodendrocitos ya que mayoritariamente se tiñen con anticuerpos anti-NG2. Además, nuestros estudios de marcaje acumulativo con BrdU indicaron la ausencia de células doblemente marcadas BrdU-NeuN en el córtex entorrinal y en el neocórtex. Por último, los resultados obtenidos indican que tras la deaferentación de las aferencias del córtex entorrinal no se produce un incremento en la tasa de proliferación de los progenitores del giro dentado como se había descrito, no así de células gliales en la zona de la lesión y en la zona denervada del hipocampo. Por el contrario, la axotomía unilateral de la fimbria-fórnix reduce la tasa proliferativa de los progenitores del giro dentado.

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

Factores neurotróficos

P 173

PAPEL DE LA METALOTIONEÍNA-III DESPUES DE UNA LESIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Carrasco J, Giralt M, Camats J, Molinero A, Hidalgo J
Instituto de Neurociencias, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona

En el presente trabajo hemos evaluado la relevancia fisiológica de la metalotioneína-III (MT-III) en el SNC tras una lesión focal en la corteza cerebral causada por congelación (criolesión). Para ello hemos evaluado la respuesta posterior a la lesión en ratones *knockout* para la MT-III (MT-III KO) y en sus controles genéticos. En los animales normales se produce astrogliosis y microgliosis en el área circundante al tejido lesionado, igualmente se observan evidencias de estrés oxidativo y apoptosis. También se produce un incremento significativo de la expresión de varias citoquinas/factores de transcripción, tales como el TNF- α , IL-1 α /b, IL-6, TGF- β , bFGF and VEGF, tanto a nivel de mRNA (*ribonuclease protection assay*) como a nivel de proteína (inmunohistoquímica). Los animales MT-III KO no difieren respecto a sus controles genéticos en estas respuestas, en clara contraposición a lo observado en estudios previos de nuestro grupo con ratones *knockout* para MT-I y MT-II (MT-I+II KO). Por el contrario, los animales MT-III KO muestran un incremento significativo, respecto a sus controles genéticos, en la expresión de las neurotrofinas NT-3 y NT-4/5 así como del factor promotor del crecimiento de neuritas GAP-43. Sorprendentemente, este efecto es opuesto al observado en los animales MT-I+II KO. Por lo tanto, al contrario que la MT-I y la MT-II, la MT-III no parece tener un efecto sobre la respuesta inflamatoria causada en el SNC tras una criolesión, pero es posible que influya en la regeneración neuronal durante el proceso de recuperación.

P 174

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Hidalgo J^a, Quintana A^a, Penkowa M^b, Borup R^c, Molinero A^a
^a Instituto de Neurociencias, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España. ^b Department of Medical Anatomy, The Panum Institute, University of Copenhagen, Denmark. ^c Department of Clinical Biochemistry, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.

El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central tras una lesión es esencial para abordar posibles vías de limitación y control de los daños ocasionados tanto en la respuesta primaria como durante la respuesta secundaria de la inflamación.

En este sentido se ha analizado un modelo animal de lesión traumática, la criolesión, que provoca una respuesta inflamatoria localizada en la corteza cerebral.

Se han evaluado los cambios en la expresión génica mediante *microarrays*, técnica que permite el *screening* de varios miles de genes simultáneamente para cada animal, dando una idea general de los mecanismos implicados en este proceso inflamatorio.

Ha sido estudiado el patrón temporal de la expresión génica en animales controles, así como en animales deficientes en interleuquina 6 (IL6KO) y en animales que sobreexpresan la proteína antioxidante metalotioneína I (TgMTI*). El uso de estos animales permite entender mejor el papel de citoquinas como la IL-6 o el estrés oxidativo puede tener en el desarrollo de la respuesta del SNC al daño de lesiones traumáticas.

P 175**EFFECTOS DE LA INYECCIÓN DE ÁCIDO KAÍNICO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE ZINC VESICULAR, LA RESPUESTA CELULAR, NEURONAL Y GLIAL, Y LA MUERTE NEURONAL**

Riba-Bosch A, Pérez-Clausell J

Departament de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona

Una parte del zinc cerebral está confinado en las vesículas sinápticas de algunas neuronas glutamatérgicas. Una liberación masiva de zinc puede causar la muerte de la neurona postsináptica. En este estudio se ha analizado el efecto del ácido kaínico (análogo del glutamato que provoca convulsiones y daño neuronal) sobre la distribución de Zn sináptico y la muerte neuronal.

Se inyectaron 100 ratas con ácido kaínico (10 mg/kg intraperitoneal) y se sacrificaron 3, 6, 12, 24, y 48 horas más tarde. El Zn vesicular se analizó con el método de Timm, la reacción celular temprana mediante el inmunomarcado de proteínas Fos, y el daño neuronal con Fluoro-Jade B. Se observó un blanqueo de Zn vesicular iniciado 12 h después de la inyección de kaínico. El blanqueo se incrementó a las 24-48 h. Las áreas más afectadas fueron el bulbo olfativo, núcleo endopiriforme, corteza piriforme y amígdala. En el hipocampo, se observaron acúmulos de Zn en el soma de las neuronas piramidales a las 6-12 h.

El marcaje de Fos se observó en el núcleo de las neuronas de todas las áreas mencionadas, así como del neocórtex. El marcaje neuronal fue máximo a las 6-12 h, y se desvaneció a las 24 h. A las 48 h, se observó el marcaje glial (con GFAP y lectina de tomate ya se observa reacción glial a las 3 h).

La degeneración neuronal se observó ya a las 6 h. El número de células y las áreas afectadas creció a lo largo del tiempo. La degeneración se observó en las áreas que mostraban marcaje temprano de Fos, excepto el neocórtex y las células granulares del giro dentado, que no degeneraron. Dado que los signos de degeneración neuronal aparecen antes que el blanqueo de Zn, la desaparición de Zn parece ser una consecuencia (degeneración anterograda) y no la causa de la muerte neuronal.

Financiación: FIS 01/0096-02.

P 176**MODIFICACIONES EN LA CAPA PLEXIFORME INTERNA DE LA RETINA DE CERDO Y RATA TRAS UN AUMENTO CRÓNICO DE LA PRESIÓN INTRAOCULAR: GLAUCOMA EXPERIMENTAL**Hernández M^a, Ruiz J^a, Urcola J^a, García M^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*

El aumento de la presión intraocular produce fundamentalmente alteraciones en las células ganglionares de la retina que conduce a la muerte selectiva de éstas. Como objetivo de este trabajo nos hemos planteado analizar si el aumento de presión intraocular durante periodos largos de tiempo afecta a la estructura de la capa plexiforme interna de la retina. Hemos utilizado, como modelo experimental, retinas de cerdos y ratas a los que se les provocó un aumento de la presión intraocular. Para ello, se indujo una obstrucción mecánica del drenaje del humor acuoso durante seis meses. Posteriormente, las retinas fueron analizadas mediante técnicas de inmunofluorescencia con distintos anticuerpos, que selectivamente marcan los componentes de la capa plexiforme interna de la retina. Se utilizaron anticuerpos contra proteínas ligantes de calcio como la calretinina, y el receptor de baja afinidad de las neurotrofinas, p75. Como consecuencia del aumento de la presión intraocular observamos, con los distintos marcadores, una desorganización en la estructura de la capa plexiforme interna de la retina. En dicha desestructuración están implicadas tanto las células ganglionares como las amacrinas y las células de Müller.

Trabajo financiado por la Comunidad Europea (Pro Age Ret QLK6-2000-00569) y a la Universidad del País Vasco (1/UPV00075.327-E14887/2002)

P 177**CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA DE CERDO EN SITUACIÓN NORMAL Y COMPARACIÓN CON UN MODELO DE GLAUCOMA EXPERIMENTAL**Vecino E^a, Ruiz-Ederra J^a, García M^a, Hernández M^a, Urcola J^a, Hernández-Barbáchano E^a, Araiz J^b, Durán J^b^a*Departamento de Biología Celular e Histología, Universidad del País Vasco.*^b*Departamento de Oftalmología, Universidad del País Vasco*

El conocimiento de la distribución exacta de los distintos tipos de células ganglionares de la retina (CGR) es fundamental para establecer el daño producido en ciertas patologías como el glaucoma. En el presente trabajo hemos utilizado la retina de cerdo, por presentar una estructura muy similar a la humana y por poder reproducir enfermedades oculares similares a las humanas. Las CGR se identificaron mediante trazado retrógrado con fluorogold desde el nervio óptico. Se estudió la densidad y la distribución por tamaños de las CGR en 5 retinas y se calcularon los valores medios en más de 600 puntos. Se observó la presencia de una banda horizontal situada 2 mm dorsal a la cabeza del nervio óptico, con máxima densidad de 7500 CGR/mm². A partir de esta banda, y hacia la periferia, la densidad decrece encontrando valores de 800 CGR/mm² en la retina media y de menos de 400 CGR/mm² en la periférica. En cuanto a la distribución por tamaños, los porcentajes de CGR pequeñas, medianas y grandes en las distintas zonas fueron: en la banda visual, más de 50%p, 20-30%*m* y 10%*g*; en la zona media de la retina: 15%p, 45-55%*m* y 30-40%*g*; y en la periferia 0-10%p, 0-50%*m* y 40-100%*g*. Estudios preliminares en un modelo de glaucoma experimental apuntan a que la muerte de las CGR es mayor en la zona dorsal.

Financiación: Com. Europea (ProAgeRet QLK6-2000-00569) y Univ. País Vasco (1/UPV00075.327-E14887/2002).

P 178**EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL POLLO**

Sanz A, Pérez-Pé R, Sarasa M, Carrodegas JA

Laboratorio de Neurobiología, Universidad de Zaragoza

Pretendemos estudiar el papel de proteínas implicadas en la enfermedad de Alzheimer en distintos aspectos del desarrollo embrionario usando el pollo como modelo. Con este fin hemos obtenido en este organismo clones para las principales proteínas que participan en el metabolismo de la proteína precursora del amiloide beta (APP) así como en la degradación del péptido amiloide. El pollo expresa las presenilinas, BACEs, nicastrina y neprilisina, y las isoformas principales de APP, APP695 y APP751. Asimismo hemos identificado genes homólogos para las APLPs y proteínas con actividad alfa-secretasa. La secuencia primaria de los genes que codifican estas proteínas muestra un alto grado de conservación con sus homólogos de mamíferos. Estos datos indican que el pollo podría utilizarse para investigar la posible función de estas proteínas durante el desarrollo embrionario.

P 179**EXCITOTOXICIDAD Y POLIAMINAS:
EL ÁCIDO L-2-CLORO-PROPIÓNICO**De Vera N^a, Camón L^a, Martínez E^b^a Departamento de Farmacología y Toxicología, IIBB (CSIC-IDIBAPS).^b Departamento de Neuroquímica, IIBB (CSIC-IDIBAPS). Barcelona.

La sobreactivación de los receptores glutamatérgicos es uno de los fenómenos desencadenantes de la muerte neuronal en el SNC. Diversos trabajos han mostrado que el proceso de muerte neuronal se asocia con una desregulación del sistema ODC/poliaminas habiéndose propuesto a la putrescina (PUT) como un marcador biológico de daño neuronal. Se presentan datos sobre la neurotoxicidad del ácido L-2-cloro-propiónico (2CPA) en la rata (Wistar). La administración de 2CPA (750 mg/kg, per os) induce un cuadro de ataxia grave que se asocia con la destrucción de las células granulares del cerebelo. Por otra parte, se ha determinado la concentración de poliaminas en la corteza cerebral (CX), el estriado (ST), el cerebro medio (CM), el pons y la médula oblongata (PM), el hipocampo (HC), el hipotálamo (HT) y el cerebelo (CB). A las 72 h de la administración del 2CPA, la concentración de la PUT se encuentra elevada en CB (x9)> PM y CM (x5)> CX, HC, ST e HT (x3). La SD y la SM están moderadamente disminuidas en el CB. El análisis histológico, tras la administración de 2CPA, confirma la presencia de lesiones en el CB y evidencia la lesión en núcleos del PM no descritas previamente.

En la actualidad, se considera al 2CPA como un agonista específico de la subclase NR2C de los receptores glutamatérgicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). La distribución de esta subclase de receptores ha sido establecida recientemente indicando que se concentran en CB y en algunos núcleos del tálamo y del pons.

En conclusión, el patrón de lesión asociado a la administración del 2CPA se aproxima a la distribución del subtipo NR2C de los receptores NMDA y la putrescina se muestra como un sensible marcador de la lesión.

Realizado con la ayuda del proyecto SAF2001-1643 (CICYT).

P 180**EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA E.
ESTUDIO EN MODELO EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD
DE HUNTINGTON EN RATAS TRATADAS CON 3-NP**Rodríguez-Martínez E^a, Barcia C^b, Herrero MT^b,
Rivas-Arancibia S^a^a Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. ^b NYNE, Dpto. de Anatomía Humana y Psicobiología, Facultad de Medicina, Campus Espinardo, Universidad de Murcia. España

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) es un inhibidor de la succinato deshidrogenasa que provoca una disminución en la producción de ATP, aumentando los niveles de radicales libres en la célula, induciendo estrés oxidativo y provocando la muerte celular. Antioxidantes liposolubles como la vitamina E, que se encuentra en las membranas celulares, pueden tener un efecto protector contra la acción de radicales libres. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antioxidante de la vit. E en el estriado de ratas después de la administración de 3-NP. Se utilizaron 54 ratas machos, divididas en 3 grupos: control, 3-NP y 3-NP + vit. E. Se analizaron los niveles de lipoperoxidación, la actividad enzimática de Gpx así como los procesos degenerativos celulares utilizando la técnica de fluorógeno (FJ). Se observó un aumento significativo en los niveles de lipoperoxidación así como un aumento en el número de agrupaciones celulares FJ+ en el grupo tratado con 3-NP. En el tratamiento con 3-NP + vit. E, los niveles en la lipoperoxidación disminuyen significativamente con respecto al tratamiento con 3-NP al igual que el número de agrupaciones celulares FJ+. La actividad enzimática de Gpx se ve disminuida en ambos tratamientos, observándose también, la formación de agrupaciones de las células que se encuentran dañadas.

Estos resultados sugieren que el uso de vit. E puede tener un efecto protector frente al estrés oxidativo deteniendo las rutas metabólicas que llevan a la muerte celular.

P 181**EXPRESIÓN DEL mRNA DEL TRANSPORTADOR
VESICULAR DE GLUTAMATO VGLUT1 EN EL HIPOCAMPO
EN LA ENFERMEDAD DE LOS GRANOS ARGIRÓFILOS**Mazó A^a, Serrats J^a, Mengod G^a, Probst A^b, Tolnay M^b, Cortés R^a^a Departamento de Neuroquímica, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Barcelona, España. ^b Division of Neuropathology, Institute of Pathology, University of Basel, Switzerland

La enfermedad de los granos argirófilos (EGA) es una patología neurodegenerativa progresiva de la clase de las tauopatías, considerada como una de las causas más frecuentes de demencia en edades avanzadas. La principal característica neuropatológica de la EGA es la presencia en el neuropilo de pequeños granos de material argirófilo, especialmente abundantes en hipocampo, amígdala, corteza entorrinal e hipotálamo, y cuyo principal componente es proteína tau anormalmente fosforilada. En este estudio hemos analizado la expresión del mRNA del transportador vesicular de glutamato VGLUT1 en el hipocampo de pacientes de EGA con demencia en comparación con enfermos de Alzheimer en etapas avanzadas (estadios V y VI de Braak) y casos control. Hemos observado una marcada disminución de la señal de hibridación de mRNA de VGLUT1 en la capa granular del giro dentado y en la lámina piramidal de los sectores CA1 y CA2/3 en EGA y en Alzheimer respecto al grupo control.

Puesto que en la EGA no se han descrito pérdidas neuronales significativas, dicha reducción en mRNA de VGLUT1 no estaría asociada a disminuciones en el número de neuronas, sino que reflejaría una regulación a la baja de este mRNA. Considerando la expresión de VGLUT1 como determinante de fenotipo glutamatérgico en neuronas, nuestros datos parecen indicar una disfunción en la transmisión glutamatérgica en tanto en EGA como en Alzheimer.

Proyecto financiado por el MCyT (SAF 2000-0212). J.S. es becario predoctoral del IDIBAPS.

P 182**INDUCCIÓN DE VCAM-1 EN LA ISQUEMIA CEREBRAL**Justicia C^a, Cervera A^b, Gironella M^c, Panés J^c, Chamorro A^b,
Planas AM^a^a Departamento de Farmacología y Toxicología, IIBB-CSIC, IDIBAPS.^b Instituto de Enfermedades Neurológicas, Hospital Clínic, IDIBAPS.^c Servicio de Gastroenterología, Hospital Clínic, IDIBAPS. Barcelona

La adhesión de leucocitos a la pared vascular media el proceso inflamatorio en la isquemia cerebral y se considera una posible diana de acción terapéutica. Hemos estudiado la inducción de la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) en el cerebro en un modelo experimental de isquemia/reperfusión en la rata. Realizamos oclusión intraluminal de la arteria cerebral media de 1 h de duración seguido de reperfusión (Justicia et al. J Cereb Blood Flow Metab 2001; 21: 1097). Evaluamos la inducción de VCAM-1 a las 16 y 24 h después de la oclusión en muestras de tejido mediante *Western blot*, y en el animal intacto mediante inyección intravenosa de un anticuerpo (Ac) monoclonal específico anti-VCAM-1 marcado con I125 y un Ac inespecífico marcado con I131, según se ha descrito anteriormente (Sans et al. Gastroenterology 1999; 116: 874). Esta técnica permite cuantificar la concentración de Ac anti-VCAM-1 unido específicamente al endotelio vascular cerebral. La expresión de VCAM-1 es baja en condiciones basales y se induce unas 3 y 4 veces respecto al valor basal a las 16 h (p<0,01) y 24 h (p<0,001), respectivamente. En el hemisferio contralateral observamos una tendencia no significativa al aumento de

expresión de VCAM-1 respecto al control. La inducción de VCAM-1 en la isquemia puede contribuir a la infiltración de células leucocitarias y al daño inflamatorio durante las primeras 24h, y por tanto el bloqueo farmacológico de este proceso podría tener interés terapéutico.

P 183

ALTERACIÓN FUNCIONAL DE LOS NÚCLEOS DE SALIDA DE LOS GANGLIOS BASALES EN RATONES NK1-KO PARKINSONIZADOS CON MPTP

Boronat J^a, Barcia C^a, García-Martínez V^a, Bernal I^a, García-Molina F^a, De Felipe C^b, Herrero MT^a

^a Neurología y Neurocirugía Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia. ^b Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández. Alicante

La pérdida neuronal en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) característica de la enfermedad de Parkinson (EP) induce una disminución de la expresión del receptor NK1 en el estriado y cambios funcionales en la vía directa e indirecta de los ganglios basales. Las proyecciones gabérgicas de la vía directa son moduladas por sustancia P (SP). En el presente experimento se utilizaron 14 ratones C57bl6, 14 ratones NK1 *wild type* (+/+) y 14 ratones NK1 carentes de receptor (-/-). Siete ratones de cada grupo fueron inyectados con MPTP (20 mg/kg IP) durante 4 días. 24 horas después del tratamiento los animales fueron sacrificados. El resto de animales se utilizaron como controles. Se evaluó la pérdida neuronal de la SNpc y el nivel de expresión de ARNm que codifica para la síntesis GAD (ARNm/GAD) en las neuronas de la sustancia negra *pars reticulata* (SNpr) y el entopeduncular. Después del tratamiento con MPTP, los ratones NK1-/- mostraron pérdida neuronal dopaminérgica similar a los NK1+/+ y C57bl6 y se observó aumento de la expresión de ARNm/GAD en la SNpr en los tres grupos, siendo significativamente mayor en los ratones NK1-/- que en NK1+/+ o C57bl6. En el entopeduncular no se vio ningún cambio. Estos datos indican que el receptor NK1 afecta a la actividad de las neuronas gabérgicas del entopeduncular y en menor medida de la SNpr. Este estudio contribuye a la comprensión del papel de la SP y de su receptor NK1 en la modulación de la vía directa de los ganglios basales en la EP.

P 185

DETERMINACIONES PLASMÁTICAS DE MELATONINA Y PROLACTINA EN MONOS TRATADOS CON MPTP. MODELO EXPERIMENTAL AGUDO

De Pablos V, Barcia C, Lucas C, Herrero MT

Neurología y Neurocirugía Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia

Han sido descritas diferentes alteraciones vegetativas en pacientes parkinsonianos así como en monos tratados con MPTP que podrían estar relacionadas con cambios en los niveles de diferentes hormonas como la melatonina y la prolactina. En el presente estudio se determinaron las concentraciones plasmáticas de melatonina y prolactina de 6 monos hembra *Macaca fascicularis* antes y después de la administración de MPTP. Para cada individuo se estudió el patrón circadiano mediante la obtención de cuatro muestras diurnas (09:00, 12:00, 15:00, 18:00) y cuatro nocturnas (21:00, 00:00, 03:00, 06:00) a intervalos de tiempo regulares y se determinaron también los valores medios de secreción global durante el día y la noche. Las concentraciones en plasma se determinaron mediante ELISA. Los resultados obtenidos en el patrón circadiano mostraron una disminución significativa de la secreción de melatonina para los monos tratados con MPTP tanto para la secreción global diurna como para las 12:00 y las 03:00 h. En el estudio de la prolactina se observó un incremento significativo en el grupo tratado con MPTP a las 18:00 y 00:00 h y un incremento altamente significativo para el mismo grupo a las 15:00 h. Estos resultados sugieren que el

déficit dopaminérgico producido por el MPTP puede inducir cambios de los niveles de melatonina Y prolactina relacionados con diferentes alteraciones vegetativas observadas en el parkinsonismo. Financiado por F. Séneca (PI388760) y MCYT (SAF2001-0479).

P 186

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DIANAS DE LOS TÓXICOS OLIVARES TRANS-CROTONONITRIL Y 3-ACETILPIRIDINA

Llorens J^a, Balbuena E^a, Seoane A^b

^a Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona.

Barcelona, España. ^b Department of Physiology. University of Bristol. UK

El trans-crotononitrilo (TCN) causa una alteración del control motor diferente a la causada por otros nitrilos, inclusive su isómero cis-crotononitrilo (Toxicol Appl. Pharmacol 2003; 187: 89-100). Un estudio preliminar señaló a la oliva inferior (OI) como área diana de esta neurotoxicidad motora. Este estudio compara las dianas del TCN y las del tóxico clásico de la OI, 3-acetilpiridina (3-AP). Se administraron ratas Long-Evans macho adultas con 3-AP (75 mg/kg, seguido por 300 mg/kg de nicotinamida a las 4,5 h), matándose 1 o 3 días después, o con TCN (250 mg/kg por día, 3 días consecutivos), matándose 1, 3 o 7 días después. El cerebro entero y trozos de médula espinal fueron seccionados en cortes de 50 µm. Una de cada tres secciones fue teñida con el colorante específico de neurodegeneración, Fluoro-Jade B. Los animales expuestos a 3-AP, en especial a los 3 días, mostraron neurodegeneración en áreas ya conocidas (Brain Res Rev 1085; 9: 21-42): OI, hipocampo, sustancia negra y área tegmental ventral, además de los núcleos rafe dorsal, hipogloso, motor del vago, ambiguo y facial. En los animales tratados con TCN se observó neurodegeneración en OI, corteza piriforme, y parte de la corteza entorrinal. A los 3 días, alguna neurona dispersa se marca en otras áreas corticales. En conclusión, los dos tóxicos tienen diferentes dianas, coincidiendo sólo la OI, y el TCN parece una mejor elección para el estudio del papel de la OI en el control motor. Financiado por FIS 00/1129.

P 187

MECANISMOS DE ESTRÉS OXIDATIVO CAUSADOS POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y POR SOBREEXPRESIÓN DE FRAGMENTO C-TERMINAL DE LA APP EN NEUROBLASTOMA SK-N-MC

Pertusa M, Sebastià J, Vilchez D, Cristòfol R, Planas AM, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C

Departamento de Farmacología y Toxicología, IIBB, CSIC-IDIBAPS. Barcelona

La acumulación del péptido beta amiloide (Aβ) se considera el factor principal en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. El Aβ induce estrés oxidativo neuronal in vitro, mientras que otros fragmentos amiloidogénicos más largos han sido poco estudiados. En el neuroblastoma humano SK-N-MC hemos estudiado comparativamente los efectos del peróxido de hidrógeno y la sobreexpresión de un fragmento C-terminal de 99 residuos de la proteína precursora del Aβ (línea celular con sobreexpresión condicional del fragmento SβC, obtenida por Sopher et al., Mol Brain Res 1994; 26: 207-17). La muerte neuronal causada por 24 h de exposición a peróxido de hidrógeno 0,1 mM y de sobreexpresión de SβC se protegió con diversos antioxidantes. El propil gallato resultó ser muy efectivo en ambos casos. Sin embargo, los mecanismos desencadenantes demostraron ser diferentes. Una hora de sobreexpresión de SβC generó un incremento de radicales hidropéroxido y superóxido, mientras que tras la exposición a peróxido de hidrógeno no se detectó incremento de superóxido. Además se registró una activación de caspasa-3 y un aumento de células TUNEL tras la exposición a peróxido de hidrógeno pero no al fragmento SβC. Por Western blot se detectó una disminución de la hemo-oxigenasa 1 tras el

tratamiento con peróxido de hidrógeno, efecto que era inhibido por el neuroprotector propil gallato.

Subvencionado por FIS 00-1094. MP y JS agradecen una beca IDIBAPS.

P 188

DISTINTO PATRÓN DE REACTIVIDAD GLIAL Y NEURODEGENERACIÓN DESPUÉS DE UNA LESIÓN EXCITOTÓXICA EN EL CEREBRO VIEJO RESPECTO DEL ADULTO

Castillo-Ruiz MM, Campuzano O, Acarín L, González B, Castellano B

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universitat Autònoma de Barcelona

El envejecimiento es uno de los factores de riesgo más importantes que predisponen a la isquemia y la respuesta glial puede determinar el resultado final de la lesión. El objetivo del estudio es comparar la respuesta glial asociada a la neurodegeneración en ratas de 3 y 24 meses tras una lesión excitotóxica (NMDA) estriatal. Los animales se sacrificaron entre 1 y 14 días poslesión (DPL) y los cerebros se procesaron para azul de toluidina, fluorojade B, TUNEL, lectina de tomate, GFAP y caspasa-3 activa. Se realizaron dobles marcajes para las células caspasa-3 y TUNEL positivas. Sin diferencias en el volumen de pérdida neuronal, la tinción con fluorojade B muestra la máxima neurodegeneración a 1DPL en el cerebro adulto y a los 3DPL en el cerebro viejo. En comparación con los adultos, los animales viejos muestran un inicio más rápido (1DPL) y mayor hipertrofia astrogial así como una igual o mayor área de activación microglial aunque el área de reactividad es menor. El máximo marcaje de caspasa-3 activa se corresponde temporalmente en ambos grupos con la máxima neurodegeneración. La mayoría de células caspasa-3 son astrocitos. En resumen, comparando con el cerebro adulto, una lesión excitotóxica en el cerebro viejo provoca un proceso neurodegenerativo más lento y una respuesta glial diferencial durante los primeros 3DPL. Al formarse la cicatriz glial las diferencias se reducen.

Financiación: La Caixa 00/074-00, DGES(BF12002-02079).

P 189

IMPLICACIÓN DE LA α -SINUCLEÍNA EN LA NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR β -AMILOIDE

Andreu C, Pérez-Sánchez F, Fariñas I

Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia. Burjassot, Valencia

La α -sinucleína es una proteína de pequeño tamaño muy abundante en terminaciones sinápticas y cuya función es desconocida. Es el constituyente mayoritario de los llamados cuerpos de Lewy, agregados proteicos citoplasmáticos característicos de la enfermedad de Parkinson. También se ha descrito su interacción directa con el péptido β -amiloidé y su presencia en las placas seniles que aparecen en la enfermedad de Alzheimer. Se considera, por tanto, a esta proteína como un posible denominador común en el origen de estas enfermedades neurodegenerativas. Para analizar la posible implicación de α -sinucleína en la neurotoxicidad mediada por el péptido β -amiloidé, se ha analizado la posible susceptibilidad diferencial a la neurotoxicidad producida por β -amiloidé en cultivos primarios de neuronas hipocámpales procedentes de embriones de ratón de 17,5 días de gestación de genotipo salvaje y de genotipo mutante nulo para α -sinucleína. La α -sinucleína se expresa en el hipocampo embrionario y la mayoría de neuronas presentes en el cultivo expresan esta molécula que se distribuye por el cuerpo celular y las neuritas y que acaba estando localizada también en las terminaciones sinápticas. El tratamiento de intoxicación con el péptido Ab25-35 25 mM y con el péptido control Ab35-25, que no tiene actividad biológica, se realizó a los 7 días *in vitro* tras la siembra. La viabilidad celular en cada

caso se determinó mediante el compuesto MTT, mediante el recuento de cuerpos apoptóticos en tinciones con DAPI y mediante tinciones con yoduro de propidio. Hemos obtenido una resistencia significativamente mayor a la toxicidad por β -amiloidé en neuronas que no expresan α -sinucleína. Estamos analizando el mecanismo por el cual puede estar produciéndose este efecto diferencial.

P 190

LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE α -SINUCLEÍNA PROTEGE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS FRENTE A LA INTOXICACIÓN CON MPTP

Buendía P, Milán M, Fariñas I, Pérez-Sánchez F

Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia. Burjassot, Valencia

La presencia mayoritaria de α -sinucleína (α SYN) en los agregados proteicos de un grupo de enfermedades neurodegenerativas (sinucleinopatías) y la asociación de mutaciones puntuales en el gen de la α SYN con casos de Parkinson (PD) familiar, han suscitado el interés por conocer los posibles mecanismos neurodegenerativos en los que estaría implicada. Algunas de las hipótesis son su interacción con subproductos del estrés oxidativo presentes en el interior celular de forma natural o como contaminantes exógenos y la alteración de los mecanismos celulares de marcaje y degradación proteica. El MPTP es ampliamente utilizado como modelo experimental de PD, produciendo específicamente la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Se conoce bien la base molecular de su especificidad y de su acción tóxica, consistente en la producción de especies moleculares oxidadas de gran reactividad. En nuestro laboratorio hemos comprobado que la ausencia de α SYN incrementa la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas frente a la intoxicación con MPTP, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta neuroprotección es aún mayor en cultivos primarios de neuronas mesencefálicas de ratones que sobreexpresan de α SYN, pudiendo indicar que un desequilibrio en los niveles de α SYN, podría estar en la base de esta neuroprotección. Para abordar diferentes mecanismos que podrían estar implicados empleamos inhibidores de la vía del proteasoma y de algunas vías de señalización intracelular.

P 191

HIPÓTESIS SOBRE LA FUNCIÓN DE LA α -SINUCLEÍNA. ESTUDIO CON CHIPS DE DNA EN RATONES KNOCKOUT

Milán M, Andreu C, Buendía P, Pérez-Sánchez F, Fariñas I

Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia. Burjassot, Valencia

La α -sinucleína (α SYN) es una proteína de localización presináptica cuyo papel podría ser importante en el funcionamiento del sistema nervioso en condiciones normales dada su presencia en la mayoría de las neuronas y su alto grado de conservación entre diferentes grupos animales. Varias mutaciones de este gen se asocian con casos familiares de la enfermedad de Parkinson y, además, su agregación anormal parece estar en la base de la neurodegeneración en ésta y otras enfermedades. Hemos realizado un análisis comparativo de la expresión génica de *Mus musculus* (array U74Av2 de Affymetrix) a partir de cDNA de hipocampo y mesencéfalo ventral de ratones deficientes en α SYN y de sus controles de genotipo salvaje. El análisis de los genes cuya expresión está alterada, entre los que existe una importante representación del entorno sináptico y del citoesqueleto, es compatible con una implicación de la α SYN en el control de la neurotransmisión, mediante mecanismos tales como el transporte y reciclaje de vesículas sinápticas. Esta asociación vendría a confirmar los datos de que ya disponemos en el mutante nulo, referidos a una regulación de la liberación de dopamina bajo determinadas condiciones en neuronas de la sustancia nigra y a deficiencias en el contenido vesicular distal de las sinapsis del hipocampo. Para la contrastación de esta hipótesis, estamos

realizando estudios ultraestructurales y bioquímicos a partir de muestras de animales *knockout* y de transgénicos para α SYN.

P 192

BÚSQUEDA DE NUEVOS FACTORES ACTIVADORES DE LAS CÉLULAS MADRE NEURALES (NSCs) DE LA ZONA SUBVENTRICULAR (SVZ) DEL CEREBRO ADULTO

Ramírez-Castillejo C, Ferrón S, Valdés-Sánchez T, Fariñas I

Unidad de Neurobiología Molecular, Dpto. de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Valencia

El aislamiento y expansión de NSCs de tejido nervioso adulto ofrece grandes posibilidades de aplicación en el campo de la regeneración neuronal. La célula madre, quiescente por definición, es capaz de autoperpetuarse y al mismo tiempo generar toda una progenie neural. Muchas de las señales necesarias para la reactivación de las NSCs son todavía desconocidas, así como los activadores de su transformación en progenitores neurales intermediarios de rápida proliferación. Estos progenitores neurales han sido descritos *in vivo* como los responsables de la proliferación masiva observada en áreas neurogénicas como la SVZ. Tras la disección de la SVZ, tanto los progenitores neurales como las verdaderas NSCs están presentes en el cultivo y ambas son posiblemente unidades formadoras de neuroesferas. En el presente trabajo nos propusimos la búsqueda de nuevas sustancias de interés sobre la proliferación de estas dos poblaciones celulares utilizando una quimioteca de hexapéptidos aleatoria. Se ha observado un efecto diferencial de algunos hexapéptidos analizados en los distintos tipos celulares presentes en el cultivo, unas de crecimiento lento y otras con mayor tasa de proliferación. La identificación de nuevos factores que afecten a la proliferación de alguna de estas poblaciones, NSCs y progenitores neurales, puede abrir nuevas vías de actuación en el panorama general de la aplicabilidad de las NSCs para trasplantes y regeneración neuronal.

P 193

GENERACIÓN DE RATONES DOBLE TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN GSK-3 β Y FTPD-17 TAU COMO MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Engel T^a, Lim F^a, Gómez-Ramos P^b, Morán MA^b, Ávila J^a, Lucas JJ^a, Hernández F^a

^a Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC/UAM. Cantoblanco, Madrid. ^b Dpto. Morfología. Facultad de Medicina, Univ. Autónoma de Madrid

Las marcas neuropatológicas definitorias de la enfermedad de Alzheimer (EA) incluyen las placas seniles (agregados extracelulares del péptido A β) y los ovillos neurofibrilares (agregados intracelulares formados fundamentalmente por la proteína tau aberrantemente hiperfosforilada). Mutaciones en proteínas que participan en el metabolismo del A β , como APP y preselininas, sugieren que los depósitos de A β inician la patología. Sin embargo, el patrón espacio-temporal de la aparición de los ovillos neurofibrilares coincide con los de muerte neuronal y sintomatología propia de EA. Además, se ha observado que la toxicidad mediada por A β desaparece en ratones *knockout* para tau. Por otro lado, se ha constatado que mutaciones en tau son suficientes para causar neurodegeneración en FTDP-17. La mayoría de los sitios que se encuentran hiperfosforilados en tau, lo son por GSK-3 β , sugiriendo que una alteración en dicha quinasa puede ser relevante en la EA. Además, se ha comprobado que la toxicidad del A β en cultivo esta mediada por la GSK-3 β .

En nuestro laboratorio, hemos generado animales transgénicos que sobreexpresan tanto la GSK3 β (EMBO J. (2001) 20:27) como la proteína tau con tres mutaciones presentes en FTDP-17 (Mol Cell Neurosci 2001; 6: 702). Nuestro objetivo consiste en cruzar dichos animales transgénicos y analizar, posteriormente, si existe un sinergismo entre la sobreexpresión de GSK-3 β y proteína tau mutante, tanto a nivel bioquímico, como histológico y comportamental.

P 195

INDUCCIÓN NEURONAL DEL INMUNOPROTEASOMA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Díaz-Hernández M^a, Hernández F^a, Martín-Aparicio E^a, Gómez-Ramos P^b, Morán MA^b, Castaño JG^c, Ferrer I^d, Ávila J^a, Lucas JJ^a

^a Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC/UAM. Madrid.

^b Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

^c Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

^d Institut de Neuropatologia, Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Prínceps d'Espanya. L' Hospitalet de Ll., Barcelona

Una de las principales marcas histopatológicas de la enfermedad de Huntington (EH) es la presencia de inclusiones intraneuronales, que además se marcan con anticuerpos antiubiquitina y antiproteasoma. Esto sugiere que una alteración del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) pudiera ser clave en la patogénesis de la EH. Además en estudios realizados en células transfectadas se ha visto que la formación de agregados lleva a la acumulación de proteínas sustrato del proteasoma. El objetivo del presente estudio es comprobar si efectivamente tiene lugar una inhibición de la actividad proteasoma *in vivo* en las neuronas que presentan estos agregados. En nuestro laboratorio hemos generado un modelo animal de EH que presenta agregados tanto en corteza como en estriado, ratones HD94 (Cell 2000; 101: 57-66; J Neurosci 2001; 21: 8772-81). En este modelo se ensayaron las tres actividades proteolíticas del proteasoma con sustratos fluorogénicos en extractos de corteza y estriado de ratones HD94 y control. En contra de lo esperado, no encontramos evidencias de la inhibición de las actividades del proteasoma, pero si un cambio cualitativo en el mismo. Éste resultó ser debido a la activación de las subunidades inducibles LMP2 y LMP7 del inmunoproteasoma. La inducción del inmunoproteasoma también se verificó en muestras de cerebro *post-mortem* de pacientes de EH, y parece presentar una correlación con neurodegeneración.

P 196

UNA NUEVA MUTACION DEL GEN DE TAU, G303V, EN UNA FAMILIA CON PARÁLISIS SUPRANUCLEAR PROGRESIVA

Ros R^a, Thobois S^b, Streichenberger N^c, Kopp N^c, Sánchez M^d, Pérez M^e, Hoenicka J^a, Ávila J^e, Honnorat J^f, G. de Yébenes J^{a,d}

^a Banco de Tejidos para Investigaciones Neurológicas. Madrid, España.

^b CERMEP and Neurology C, Hopital Neurologique. Lyon, France.

^c Department of Neuro-Pathology, Hopital Neurologique. Lyon, France.

^d Fundación Jiménez Díaz, UAM. Madrid, España.

^e Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM. Madrid, España.

^f Neurologie B, Hopital Neurologique. Lyon, France

La parálisis supranuclear progresiva (PSP) es un síndrome clínicopatológico caracterizado por parkinsonismo, trastornos del movimiento, demencia frontolímica y otros déficit clínicos. A nivel histopatológico se detecta atrofia, pérdida neuronal y gliosis con depósitos de la proteína tau en neuronas y astrocitos en el tronco del encéfalo, diencéfalo y corteza. Generalmente, PSP es esporádica y de etiología desconocida, aunque en algunos casos se han descrito pacientes de PSP con mutaciones en el gen de tau. Nosotros describimos una nueva mutación en una familia de PSP con patrón de herencia autosómica dominante y comienzo precoz. La nueva mutación consiste en la transversión de una guanina en la posición 2099 del cDNA por una timina, que origina en el péptido mutante el cambio de una glicina por una valina en la posición 303 (G303V), en la región correspondiente al segundo dominio de unión a tubulina de la proteína tau. El análisis neuropatológico mostró atrofia severa del tronco del encéfalo y ganglio basal, y una atrofia moderada de la zona frontotemporal. La pérdida neuronal y los depósitos de tau en neuronas y glía también se observaron en varias zonas. El análisis de proteína reveló un incremento de la expresión de las isoformas de tau con cuatro dominios de unión a microtúbulos. La mutación G303V podría incrementar el *splicing* del

exón 10 del gen de tau y, de esta manera, incrementarse la proporción 4R/3R en el cerebro del paciente.

Neuroanatomía

P 197

CONTROL DUAL DE LA VÍA INDIRECTA POR AFERENTES TALÁMICOS PROCEDENTES DEL NÚCLEO PARAFASCICULAR

Castle M^a, Gonzalo N^a, Vázquez A^b, Sierra S^a, Aymerich M^c, Lanciego JL^d

^aDepartamento de Anatomía, Universidad de Navarra. ^bServicio de Neurocirugía, Servicio Navarro de Salud. ^cDepartamento de Bioquímica, Universidad de Navarra. ^dDepartamento de Histología, Universidad de Navarra. Pamplona

El presente trabajo analiza las relaciones existentes entre el núcleo parafascicular del tálamo (PF) y la denominada 'vía indirecta' de los ganglios basales. Mediante el empleo de técnicas de múltiple trazado neuronal han sido estudiadas las aferencias talámicas desde PF hacia el estriado y hacia el núcleo subtalámico (STN), y sus relaciones con las neuronas de proyección estriatopalidales y subtalamopalidales, así como con los distintos subtipos de interneuronas estriatales.

Nuestros resultados demuestran que los aferentes talámicos entran en relación con las neuronas estriatofugales origen de proyecciones hacia el globo pálido externo (GPe), así como con los distintos subtipos de interneuronas del estriado. Además, las neuronas de STN que proyectan hacia GPe son la aparente diana postsináptica de los aferentes talámicos a STN.

Estos datos sugieren que las neuronas de PF ejercen una modulación dual sobre la actividad resultante de la vía indirecta, al contactar mediante sinapsis excitadoras tanto con neuronas de proyección estriatopalidales como con neuronas de proyección subtalamopalidales. La existencia de solapamientos entre aferentes talamoestriados e interneuronas del estriado también debe de ser tenida en cuenta a la hora de analizar estos tipos de circuitos complejos.

Financiación: proyectos de investigación del FIS, ref.: 01/0237, Departamento de Educación del Gobierno de Navarra, y Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research.

P 198

DISTRIBUCIÓN DE INMUNORREACTIVIDAD A LA GALANINA EN EL ENCÉFALO DEL ESTURIÓN (*CHONDROSTEI, ACIPENSER BAERI*)

Adrio F, Rodríguez MA, Anadón R, Rodríguez-Moldes I

Dpto. Biología Celular e Ecología, Facultad de Biología, Universidade de Santiago de Compostela

La galanina es un péptido de 29 aminoácidos ampliamente distribuido en el encéfalo de vertebrados. Se considera que actúa como neuromodulador inhibitor, aunque también se han demostrado sus efectos excitadores. Aunque se conoce la distribución de este péptido en el encéfalo de teleosteos, considerado el grupo de peces óseos más avanzado, se desconoce la organización del sistema galaninérgico en peces óseos primitivos, como los condrosteos, lo que sin duda tiene un gran interés filogenético. En este estudio hemos determinado la distribución de neuronas y fibras inmunorreactivas a galanina (GALir) en el encéfalo de un esturión mediante la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas. Nuestros resultados evidencian la presencia de abundantes células GALir de tipo líquido cerebrospinal-contactante (LC-C) en el telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo tuberal y posterior. La innervación galaninérgica es muy abundante en el bulbo olfatorio, telencéfalo, área preóptica, hipotálamo, techo óptico, y rombencéfalo. El patrón de

distribución es similar a lo observado en otras especies de peces, aunque la presencia de galanina en numerosas células de tipo LC-C sugiere que se trata de una característica primitiva. Su presencia en fibras de la neurohipófisis y sus cordones interdigitados con la pars intermedia indica que este péptido ejerce un papel hipofisiotrópico. Además, su amplia distribución extrahipotalámica en el esturión sugiere que también interviene en numerosos circuitos sensoriales y motores.

Financiación: MCyT (BXX2000-0453-C02-01) y Xunta de Galicia (PGIDT99BIO20002 y PGIDT01PXI20007PR).

P 199

CONECTIVIDAD DEL TECHO ÓPTICO DE LA CARPA DORADA (*CARASSIUS AURATUS*) CON LA FORMACIÓN RETICULAR MESENCÉFALICA Y ROMBENCÉFALICA

Pérez-Pérez MP, Luque MA, Herrero L, Núñez-Abades PA, Torres B Dpto. Fisiología y Zoología, Universidad de Sevilla

El techo óptico de la carpa dorada interviene en la generación de los movimientos de orientación, enviando una señal motora a través de la formación reticular del mesencéfalo y rombencéfalo a las motoneuronas extraoculares. Dicha señal se ajusta con otra de retroalimentación procedente de las dianas reticulares. Este trabajo estudió la conectividad recíproca entre regiones reticulares y sitios tectales con diferentes propiedades motoras. El trazador bidireccional biotina dextrano amina se inyectó en sitios tectales anteromediales, que inducen movimientos oculares con pequeño componente horizontal y gran componente vertical, o posteromediales, donde se inducen movimientos con gran componente horizontal y pequeño componente vertical. Los somas y botones marcados se localizaron en la formación reticular del mesencéfalo y rombencéfalo. Los somas se situaron en el área de mayor densidad de botones; además éstos se observaron próximos a neuronas retrógradamente marcadas, sugiriendo la presencia de un circuito de retroalimentación tectorreticular. Tras la inyección anteromedial, la mayoría de botones y neuronas se encontraron en la formación reticular rostral al núcleo oculomotor, mientras que tras la inyección posteromedial, se localizaron en la formación reticular mesencéfala caudal. Estos resultados sugieren una conectividad topográfica entre diferentes sitios tectales y la formación reticular mesencéfala.

Financiado con una ayuda MCYT BFI2000-0335.

P 200

CODIFICACIÓN DE LOS MOVIMIENTOS DE ORIENTACIÓN POR LA VÍA TECTORRETICULAR EN LA CARPA DORADA (*CARASSIUS AURATUS*)

Luque MA, Pérez-Pérez MP, Herrero L, Núñez-Abades PA, Torres B Dpto. Fisiología y Zoología, Universidad de Sevilla

Estudios de la participación de la vía tectorreticular en la generación de movimientos oculares de orientación en peces permitiría sugerir mecanismos de codificación comunes y específicos en los vertebrados. Con este fin, se estudió mediante técnicas de estimulación eléctrica la implicación del techo óptico y de la formación reticular del mesencéfalo en la generación de movimientos oculares en la carpa dorada. La activación eléctrica de diferentes sitios tectales produjo movimientos oculares que cambiaron su componente vertical de hacia arriba a hacia abajo con el eje mediolateral, mientras que el componente horizontal aumentó con la distancia al polo rostral del techo. Estos datos sugieren que en el techo el movimiento se codifica en términos espaciales. La estimulación eléctrica de la formación reticular del mesencéfalo produjo, según el sitio estimulado, movimientos oculares verticales y horizontales puros. Esto sugiere que los comandos tectales preoculomotores podrían ser decodificados en un sistema cartesiano por generadores vertical y horizontal. La estimulación de la formación reticular también produjo movimientos oblicuos de diferente dirección, sugiriendo que la información procedente de los generadores

horizontal y vertical podría ser integrada a este nivel antes de alcanzar a las motoneuronas. Finalmente un centro generador de movimientos oculares convergentes se encontró en el polo rostral del mesencéfalo. Financiado con una ayuda de MCYT BFI2000-0335.

P 201

ANÁLISIS COMPARADO DE LAS POBLACIONES NEURONALES INMUNORREACTIVAS PARA CALBINDINA-D28K Y CALRETININA EN LA MÉDULA ESPINAL DE *XENOPUS LAEVIS*

Morona R, López JM, Moreno N, Muñoz M, González A
Dpto. Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense. Madrid

En el presente trabajo se ha estudiado la distribución de dos proteínas ligantes de calcio, calbindina-D28K (CB) y calretinina (CR) en la médula espinal del anfibio anuro *Xenopus laevis*. Se observaron neuronas CB+ dispersas en prácticamente todos los campos de la sustancia gris espinal. La mayoría se localiza en el campo dorsal superficial, la región gris central y en el campo ventral, inmediatamente medial y dorsal a la columna motora ventral. Este patrón es básicamente común en todos los segmentos espinales. Además de los somas neuronales, numerosas fibras CB+ se organizan longitudinalmente en el funículo ventral y ventrolateral, dando ramificación hacia la zona motora en distintos puntos. En niveles cervicales fibras aferentes primarias CB+ se marcaron claramente junto con sus característicos campos terminales en la porción basal de la sustancia gris dorsal. En los ganglios dorsales cervicales también se observaron subgrupos de neuronas CB+. La distribución de células CR+ parece ser mucho más restringida. En todos los niveles espinales se observaron grupos compactos de pequeñas neuronas en el campo gris dorsal y únicamente unas pocas células dispersas se marcaron en la porción gris intermedia o ventral. El número de fibras CR+ en la médula espinal es muy escaso y, de forma llamativa, sobresale un pequeño tracto en el funículo ventrolateral (Lissauer) que tras penetrar dorsalmente en niveles lumbares caudales, asciende hasta la médula cervical y va originando fibras hacia el campo dorsolateral. La localización diferencial y selectiva de estas dos proteínas ligantes de calcio en la médula espinal sugiere un papel de éstas en el procesamiento espinal de vías sensitivas nociceptivas y viscerales.

P 202

VÍAS VOMERONASALES CENTRALES EN EL SNC DE ANFIBIOS ANUROS

Moreno N, López JM, Morona R, Muñoz M, González A
Dpto. Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense. Madrid

El sistema vomeronasal de vertebrados se encarga de la detección de sustancias químicas complejas, como feromonas, que son esenciales en comportamientos sociales y reproductivos. La información vomeronasal alcanza el bulbo accesorio olfativo (AOB) a través del órgano vomeronasal y es enviada hacia el componente medial del complejo amigdalino. En el presente trabajo mediante técnicas de trazado neuronal se ha estudiado las vías vomeronasales centrales en el sistema nervioso central de los anuros, *Xenopus laevis* y *Rana perezi*. En éstos, el AOB constituye la principal aferencia de la amígdala medial (MeA), que puede ser por tanto considerada como el principal centro vomeronasal secundario en el SNC. Estas técnicas de trazado se han combinado con técnicas inmunohistoquímicas con el fin de estudiar la quimioarquitectura de esta zona. Las principales conexiones de la MeA son con otras regiones telencefálicas, como áreas septales, palios medial y lateral, ganglios basales y especialmente otras regiones amigdalinas. Caudalmente, está fuertemente conectada con regiones hipotálamicas. Desde el diencéfalo, recibe información multisensorial desde el tálamo dorsal y en menor medida desde el ventral. Las proyecciones desde regiones tegmentales son muy escasas, así como desde el rombencéfalo, siendo la proyección desde el rafe la aferencia más caudal que recibe.

Estos datos anatómicos indican el papel principal de la MeA en el procesamiento de la información vomeronasal en anuros, actuando como centro de integración de dicha información e importante fuente de eferencias hacia el hipotálamo, que juega un papel decisivo en la respuesta comportamental del animal a dichos estímulos. Financiación: DGCYT BOS2000-0559.

P 203

CODISTRIBUCIÓN/COLOCALIZACIÓN DE NEURONAS NITRÉRGICAS Y MONOAMINÉRGICAS EN EL SNC DE LOS ANFIBIOS

López JM, Moreno N, Morona R, Muñoz M, González A
Dpto. Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense. Madrid

Mediante la aplicación de técnicas de doble inmunohistoquímica para la detección de la sintasa del óxido nítrico (NOS) y de la tirosina hidroxilasa (TH) así como de la serotonina (5HT), se ha estudiado la coexpresión de la actividad nitrérgica y monoaminérgica en el SNC de los anfibios anuros *Rana perezi* y *Xenopus laevis*, y del urodelo *Pleurodeles waltl*. Los resultados muestran una extensa codistribución entre ambos tipos de poblaciones neuronales a lo largo de todo el SNC que contrasta con la muy restringida colocalización entre ambos marcadores. En anuros se ha encontrado que aproximadamente el 80% de las células 5-HT+ de la larga columna medial del rafe son también nitrérgicas. Combinando técnicas inmunohistoquímicas con trazado neuronal retrógrado se ha comprobado que algunas de estas células doblemente marcadas inervan la médula espinal. En urodelos, también existe una zona restringida de colocalización NOS/5-HT en los niveles rombencefálicos del núcleo motor del nervio glosofaríngeo. Aquí el porcentaje de células doblemente marcadas es menor que en anuros (40%, aproximadamente). Así pues, en subnúcleos específicos dentro de la larga columna serotoninérgica del rafe, el óxido nítrico podría modular la liberación y la acción de la serotonina. De igual forma se ha observado una amplia codistribución entre las poblaciones neuronales nitrérgicas y catecolaminérgicas en el bulbo olfativo, el área preóptica y el núcleo del tracto solitario. Las células noradrenérgicas del locus coeruleus de todos los anfibios estudiados no presentan actividad nitrérgica, a diferencia de las células colinérgicas del núcleo tegmental laterodorsal que son mayoritariamente NOS+. Solamente se encontró coexpresión NOS/TH en algunas células del tubérculo posterior de los anfibios anuros.

P 204

DISTRIBUCIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD A GAD, TH y MET-ENCEFALINA EN EL BULBO OLFATORIO DE UN ELASMOBRANQUIO, LA PINTARROJA (*SCYLIORHINUS CANICULA*)

Sueiro C, Anadón R, Rodríguez-Moldes I
Departamento de Biología y Ecología, Universidade de Santiago de Compostela

Estudios morfológicos clásicos sobre la organización del bulbo olfatorio (BO) de peces han revelado ciertas diferencias con la organización observada en el BO de tetrápodos, como la ausencia de la capa plexiforme externa y de células periglomerulares. Esto ha llevado a sugerir que los circuitos olfatorios no resultan idénticos en todos los vertebrados. En este trabajo analizamos la distribución de inmunorreactividad a anticuerpos contra el enzima de síntesis del GABA, la glutamato descarboxilasa (GAD), con objeto de conocer la organización del sistema gabérgico presente en el BO de pintarroja y poder compararlo con el existente en otros vertebrados. Con el fin de complementar la caracterización neuroquímica del BO de pintarroja también hemos analizado la distribución de inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa (TH) y a Met-encefalina (Met). En la capa granular hemos identificado células granulares inmunorreactivas (+) a los tres anticuerpos que parecen ser las responsables de la abundante inervación GAD+/TH+/

Met+ observada en los glomérulos. También hemos observado células periglomerulares GAD+/TH+ que contribuyen con sus prolongaciones a la innervación de glomérulos adyacentes. Dobles marcajes fluorescentes analizados con el microscopio láser confocal evidencian células periglomerulares TH+ pero GAD-. En la capa de fibras olfatorias hemos observado células y prolongaciones GAD+/TH-/Met-. Estos estudios revelan que la organización del BO de elasmobranchios no resulta tan diferente a la de mamíferos como se afirmaba inicialmente.

Trabajo financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BXX2000-0453-C02) y la Xunta de Galicia (PGIDT99BIO20002 y PGIDT01PXI20007PR).

P 205

CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA DEL NÚCLEO BASAL MAGNOCELULAR: ESTUDIO ONTOGÉNICO EN LAGOMORFOS

Contreras-Rodríguez J, Morales-García JA, Marín-García P, Martínez-Sainz P, Rodríguez-Veiga E, González-Soriano J

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid

El núcleo basal magnocelular o de Meynert (NBM) es la principal fuente de innervación colinérgica hacia la neocorteza. Está constituido por células colinérgicas localizadas en el prosencéfalo basal, extendiéndose desde el septo y el núcleo de la banda diagonal de Broca hasta la parte más caudal del globo pálido. Estas neuronas podrían ser responsables de algunas de las alteraciones que se presentan en relación con la edad y la neurodegeneración, incluida la enfermedad de Alzheimer. La caracterización neuroquímica del NBM se ha realizado en varias especies. En los primates, incluido el hombre, y en el gato, la mayoría de las células colinérgicas contienen la proteína ligante de calcio calbindina y en esta última especie, también NADPH-diaforasa. Por el contrario, estudios realizados en roedores indican que las neuronas colinérgicas del NBM no expresan ni calbindina ni NADPH-diaforasa. Hemos realizado la caracterización morfológica y neuroquímica del NBM en el conejo tanto en desarrollo como en individuos adultos.

La localización del NBM en esta especie parece ser diferente a la que tradicionalmente se ha descrito en otras especies. Hemos encontrado grupos de neuronas con características de células pertenecientes al NBM en situaciones más dorsales y más caudales a las reseñadas previamente. Nuestros resultados muestran que las neuronas del NBM en el conejo son nitrérgicas e igualmente expresan calbindina. Estas características neuroquímicas aparecen tanto en el desarrollo como en el individuo adulto. De acuerdo con estos datos, el conejo podría ser un modelo adecuado para analizar aquellos procesos relacionados con la neurodegeneración en los que esté implicado el daño de neuronas colinérgicas.

P 206

ORGANIZACIÓN DE LAS POBLACIONES SEROTONINÉRGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA LAMPREA DE MAR

Abalo XM, Villar-Cheda B, Pérez-Costas E, Meléndez-Ferro M, Anadón R, Rodicio MC

Departamento de Biología Celular e Ecoloxía, Universidade de Santiago de Compostela

La lamprea de mar presenta un ciclo de vida complejo con distintas etapas que requieren diferentes adaptaciones anatómicas y fisiológicas. Así, las larvas viven enterradas en el lecho fluvial, son ciegas y se alimentan por filtración, mientras que los adultos viven en el mar y son parásitos de peces. Mediante métodos inmunohistoquímicos hemos estudiado la organización de los sistemas serotoninérgicos de la lamprea de mar a lo largo de su vida. El sistema nervioso central de las larvas de lamprea presenta cuatro poblaciones serotoninérgicas diencefálicas: en el órgano

pineal, la zona *limitans*, la región tuberal y la región mamilar. También tienen poblaciones serotoninérgicas ístmicas, otra en el rombencéfalo caudal y células serotoninérgicas de la médula espinal. Las ístmicas aparecen en embriones tardíos mientras que las restantes poblaciones lo hacen en prolarvas, excepto la mamilar, que aparece en larvas tempranas. Nuestros resultados muestran además diferencias en la organización de los sistemas serotoninérgicos entre larvas y adultos. Además de los grupos larvarios, las lampreas de mar adultas presentan otras tres poblaciones: en el órgano parapineal, en la retina y en la región tálamo-pretektal. La población parapineal aparece en individuos premetamórficos, mientras que la población de la retina y la tálamo-pretektal lo hacen durante la metamorfosis. La aparición de la población retiniana y la tálamo-pretektal durante la metamorfosis sugiere que esos cambios están relacionados con la maduración del sistema visual, que no adquiere su completa funcionalidad hasta después de la metamorfosis.

Trabajo financiado por el MCYT (BMC2000-0283) y la Xunta de Galicia (PGIDT99PXI20003B).

P 207

DISTRIBUCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN LA FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO HUMANO EN DESARROLLO

Cebada-Sánchez S^a, Marcos P^a, García-López R^a, Arroyo-Jiménez MM^a, Mohedano-Moriano A^a, Hernández-Sansalvador M^a, Martínez-Marcos A^a, Artacho-Pérola E^a, Tramu G^b, Blaizot X^a, Insausti R^a

^aLaboratorio de Neuroanatomía Humana, Universidad de Castilla-La Mancha, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Albacete. ^bLaboratoire de Neurocytochimie Fonctionnelle, Université de Bordeaux I, Francia

La formación del hipocampo se localiza en el lóbulo temporal y está compuesta por distintas estructuras conectadas entre sí de forma unidireccional. La integridad de estas conexiones es esencial para los procesos de memoria y aprendizaje. Se sabe que estas conexiones comienzan ya a establecerse durante la vigésima semana de desarrollo embrionario. En el nacimiento, la organización de la formación del hipocampo es prácticamente similar a la del adulto, aunque con perfiles más inmaduros. El objetivo de este trabajo es el estudio de la distribución de diferentes neuropéptidos durante el desarrollo posnatal utilizando técnicas inmunohistoquímicas. A las 35 semanas de gestación hemos observado perfiles marcados con neuropéptido Y (NPY), somatostatina (Som), metionina-enkefalina-8 (Met-enk) y galanina (Gal) en la circunvolución dentada y en el subículo. En CA3 se ha detectado además leucina-enkefalina (Leu-enk). En CA2 se han encontrado NPY, Gal y neurotensina (NT); y en CA1, NPY y Som. El NPY se ha observado en las cortezas entorrinal, perirrinal y parahipocámpica. A los cinco años de desarrollo posnatal se observan cambios en el patrón de distribución de NPY y Gal en las regiones en las que aparecen; también en esta edad se detecta parvalbúmina, que no se observa en edades más tempranas. Estos resultados preliminares sugieren que los neuropéptidos estudiados podrían tener un papel en la maduración postnatal de las diferentes estructuras que componen la formación del hipocampo.

P 208

ORGANIZACIÓN DE LOS SISTEMAS GABÉRGICOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL ESTURIÓN (ACIPENSER BAERI)

Adrio F, Sueiro C, Anadón R, Rodríguez-Moldes I

Dpto. Biología Celular e Ecoloxía, Universidade de Santiago de Compostela

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (SNC). Su presencia puede ser detectada inmunocitoquímicamente mediante anticuerpos contra GABA o bien contra su enzima de síntesis, la glutamato descarboxilasa (GAD), lo que permite conocer la organización de los sistemas gabérgicos en el SNC. Hasta ahora, todos los estudios

sobre los sistemas gabérgicos de peces óseos han sido hechos en el grupo más avanzado, los teleosteos. Para conocer la evolución de estos sistemas, hemos estudiado la distribución de inmunorreactividad a anticuerpos contra GABA y GAD en el SNC de un pez óseo primitivo, el esturión. Nuestros resultados evidencian la presencia de células inmunorreactivas a ambas sustancias (GABA/GADir) en todas las regiones encefálicas del esturión como bulbo olfatorio, telencéfalo dorsal y ventral, núcleo preóptico parvicelular y órgano del receso preóptico, tálamos, lóbulos hipotalámicos e hipotálamo tuberal, pretecho, techo óptico, cerebelo, gris central, área octavolateral, lóbulo del vago y paredes del canal central espinal. También hemos observado una abundante innervación gabérgica en todas estas regiones. Algunos tractos como el tracto hipotálamo-hipofisario y el tracto del saco vasculoso contienen abundantes fibras GABA/GADir. El análisis comparativo de nuestros resultados demuestra que la abundancia de poblaciones gabérgicas en el encéfalo de condrosteos está en línea con los resultados obtenidos en otros peces y en tetrápodos. Los esturiones comparten con los ciclóstomos características como la presencia de células gabérgicas del tipo líquido cefalorraquídeo-contactante en regiones hipotalámicas.

Financiado por Ministerio de Ciencia y Tecnología (BXX2000-0453-C02-01) y Xunta de Galicia (PGIDT99BIO20002 y PGIDT01PXI20007PR).

P 209

ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO DE LA AMÍGDALA SUBPALIAL-EXTENDIDA DE POLLO DURANTE EL DESARROLLO

Pineda D, Dávila JC, Real MA, Guirado S

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología,
Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

La amígdala es una compleja estructura constituida por una serie de núcleos de origen tanto palial como subpalial situados en la región caudal del telencéfalo. Presentamos aquí un estudio inmunocitoquímico de la amígdala subpalial de pollo durante el desarrollo, desde HH40 a individuo adulto, utilizando como marcadores la sintasa del óxido nítrico (NOS) y las proteínas parvalbúmina (PV), calbindina (CB) y calretinina (CR). El núcleo *Taeniae* (Tn) presenta un incremento de expresión CB y CR durante el desarrollo, mientras que el marcaje NOS se muestra regular durante todo el proceso. Podemos postular además la existencia de una porción extendida de este núcleo, definida a partir de la expresión de los marcadores descritos, y con localización ventral a la parte medial del núcleo del lecho de la estría terminalis (BSTm). Existen sin embargo diferencias entre Tn y BSTm, consistentes en una ausencia de marcaje CR y en una menor expresión de NOS y CB en este último núcleo. El BSTm muestra también variaciones de expresión con respecto a la porción lateral del BST (BSTl), pobre en NOS, con mayor número de células CB y abundante en neuropilo CR, pudiéndose definir diferentes subregiones de BSTl con patrones de expresión característicos. Las diferencias presentes en BST resultan coherentes con las hipótesis de homología actuales, en las que se relaciona al BSTm y al Tn con la amígdala medial de mamíferos y al BSTl con la amígdala central. Financiado por BFI2000-1359-C02-01.

P 210

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE NERVIOS PERIFÉRICOS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA MÚLTIPLE POSTINCLUSIÓN, MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA, Y ESTEREOLOGÍA

Negredo P, Castro J, Avendaño C

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

El estudio cuantitativo de los nervios periféricos es ineludible para evaluar sus procesos de desarrollo, degeneración y regeneración. Su ejecución sigue constituyendo un reto metodológico, por requerir de una

combinación de técnicas de marcado molecular específico, y métodos insesgados para el recuento y la medición de los diversos componentes. Presentamos un procedimiento que combina el inmunomarcado de tres antígenos sobre cortes transversales semifinos consecutivos de nervios, con métodos estereológicos sobre cortes ultrafinos intercalados, con los que estimamos el número de fibras mielínicas y amielínicas, y la fracción de área ocupada por cada componente. Sobre los cortes semifinos identificamos y contamos las fibras positivas para ChAT, VIP o TH. La correlación entre éstas y las imágenes ultraestructurales permite asociar axones individuales a una inmunorreactividad específica y determinar la co-localización de diversos antígenos en la misma fibra. El nervio ciático de la rata contiene 29.000-43.000 axones, 69% de ellos amielínicos; de éstos, el 55% expresan VIP, el 4% expresan TH y el 18% expresan simultáneamente VIP y TH. En el nervio mediano del gato proximal a la muñeca hay 14.000-20.000 axones, 77% de ellos amielínicos, de los que 25%-37% expresan TH. Muy pocos axones expresan ChAT, y sin co-localizar con TH. Este abordaje permite caracterizar la composición de un nervio periférico y evaluar cuantitativamente los cambios inducidos en el mismo por manipulaciones experimentales.

Financiado por el proyecto IST-2001-34892 de la UE.

P 211

EL LÓBULO TEMPORAL ROSTRAL EN EL PRIMATE: CONECTIVIDAD VISUAL CORTICAL

Mohedano-Moriano A, Martínez-Marcos A, Arroyo-Jiménez MM, Marcos P, Artacho-Pérula E, Blaizot X, Úbeda-Bañón I, Cebada-Sánchez S, Ruiz-López C, García-López R, Hernández-Sansalvador M, Insausti R

Dpto. Ciencias Médicas, Facultad de Medicina, Laboratorio de Neuroanatomía Humana, Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete

El lóbulo temporal rostral (RTL) de primates es una región que incluye el polo temporal y áreas adyacentes. El RTL consta de una serie de áreas corticales de asociación unimodal (olfativa, auditiva y visual) y polimodal, si bien su funcionalidad global es desconocida. El presente estudio pretende caracterizar las porciones del RTL implicadas en el procesamiento visual. Para ello, se han utilizado un total de cuatro animales (*Macaca fascicularis*) en los que se han inyectado trazadores retrógrados (Fast Blue y Diamidino Yellow) en el labio ventral del surco temporal superior (STS) (área TE) y en el área TE próxima a la corteza perirrinal. Las inyecciones localizadas medialmente en el área TE del labio ventral, dan lugar a marcaje retrógrado fundamentalmente en el fondo del STS, cortezas perirrinal y entorrinal rostral lateral (Elr). Sin embargo, en las inyecciones localizadas lateralmente en el área TE del labio ventral se observa un patrón de marcaje similar a las inyecciones anteriores, excepto la presencia de marcaje en Elr. En las inyecciones centradas en el área TE próxima a la corteza perirrinal, se observa un marcaje en regiones del área TE próximas al lugar de inyección así como un marcaje más profuso que en los casos anteriores en la corteza perirrinal. Estos resultados evidencian una cierta topografía en las aferencias hacia áreas visuales dentro del RTL. Subvencionado por BFI2000-0418.

P 212

PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL ROMBENCÉFALO DE LA LAMPREA DE MAR

Villar-Cheda B, Abalo XM, Meléndez-Ferro M, Pérez-Costas E, Anadón R, Rodicio MC

Departamento de Biología Celular y Ecología, Área de Biología Celular,
Universidad de Santiago de Compostela

En este trabajo se estudia la proliferación y diferenciación temprana en el rombencéfalo de la lamprea de mar mediante la detección inmunohistoquímica de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) y un marcador neuronal temprano (HNK-1). Las células con inmunorreactividad a PCNA

(PCNA-ir) se localizan en la zona ventricular (ZV), y la actividad proliferante muestra un máximo que coincide con la formación de los rombómeros. En prolarvas y larvas tempranas, se puede diferenciar una región anterior con 6 rombómeros y una extensa región caudal aparentemente no segmentada. Los límites interromboméricos son bandas de intensa proliferación. En la placa alar la ZV es fina, con una sola fila de células PCNA-ir, mientras que en la placa basal se diferencia una región dorsal donde la ZV es más gruesa, y otra ventral con células PCNA-ir dispersas. En la región no segmentada podemos diferenciar dos regiones, una anterior con el mismo patrón que la región con rombómeros, y otra posterior donde la ZV aumenta de grosor, especialmente en la placa alar. La región caudal anterior parece corresponder con los rombómeros 7 y 8 descritos por Gilland y Baker (1995). La proliferación disminuye en larvas y al finalizar el periodo larvario sólo quedan células PCNA-ir dispersas en la ZV. Las primeras neuronas HNK-1-ir aparecen en la región istmica de embriones tardíos. Tras la eclosión aparecen las primeras células HNK-1-ir en los ganglios craneales y también las primeras motoneuronas HNK-1-ir en el rombencéfalo. En el rombencéfalo de prolarvas, las poblaciones neuronales HNK-1-ir se disponen en bandas longitudinales, y con el desarrollo se diferencian en la mayoría de las regiones cuatro de esas bandas. Trabajo financiado por el MCyT (BCM 2000-0283) y la Xunta de Galicia (PGIDT99PXI20003B).

P 213

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ENGRAILED-2 EN EL NÚCLEO ECTOMAMILAR

Félix E^a, Pérez LR^a, Puelles L^b

^a Departamento de Morfología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

^b Departamento de Ciencias Morfológicas y Psicobiología, Universidad de Murcia

El núcleo ectomamilar (EM) es una población diencefálica caudoventral. La mayoría de los autores sitúan a este núcleo en el tegmento mesencefálico. Martínez de la Torre (1985) observó en reptiles que este núcleo hace relieve en la superficie caudoventral del diencefalo, en el prosómero 1 de Puelles (1995), mientras que en el pollo el EM parece sobrepasar el límite sinencefaloparencefálico en dirección rostral. Se plantea la pregunta de si el origen embriológico de este núcleo es simple o múltiple. Hemos comenzado a abordar esto explorando la posible participación de células mesencefálicas al EM de pollo.

Se ha estudiado para ello la expresión en el núcleo EM de la proteína En2 (codificada por el gen *engrailed-2*, característico del mesencefalo) con el anticuerpo monoclonal 4D9 a lo largo de la embriogénesis. Se han utilizado embriones de pollo de los estadios de Hamburger y Hamilton desde HH 34 (8 días) hasta HH 46 (21 días). Se han comparado con series paralelas teñidas con Cresil Violeta.

En los estadios HH34 y HH35, una banda de neuronas En²⁺ llega hasta la zona de localización del núcleo EM, aunque no se distingue el relieve del núcleo en la superficie pial.

En los siguientes estadios, las neuronas En²⁺ ya se encuentran más agregadas, formando parte del núcleo EM, y estando las neuronas positivas en la zona basal y caudal del núcleo.

En los estadios más avanzados, las neuronas En²⁺ se encuentran agrupadas en la zona más caudal del núcleo.

En HH46, las neuronas En²⁺ siguen estando agrupadas en la zona caudal del núcleo, aunque aparecen neuronas + en la zona rostral. Con Cresil Violeta, en la zona más caudal del núcleo se distinguen neuronas más compactas, las cuales parecen corresponder a la zona con neuronas En²⁺. Financiado por el Gobierno de Canarias, PI2000-056.

P 214

LAS CÉLULAS PROFUNDAS DE AXÓN CORTO QUE CONTIENEN VIP INERVAN SELECTIVAMENTE A OTRAS INTERNEURONAS DISTINTAS DE LOS GRANOS EN EL BULBO OLFATORIO

Gracia-Llanes FJ, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ

Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia

En este trabajo investigamos las dianas de una población de células profundas de axón corto que contienen polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) en el bulbo olfatorio (BO). Se asume que las células profundas de axón corto inervan a células granulares, pero su conectividad sináptica no ha sido demostrada. Nuestros resultados indican que las células profundas de axón corto que contienen VIP son interneuronas gabérgicas especializadas en la innervación selectiva de otras células profundas de axón corto también gabérgicas. Sus axones contactan con la región perisomática y la porción proximal de las dendritas de células profundas de axón corto que contienen VIP, calbindina D-28k, y neuropéptido Y. La microscopía electrónica revela sinapsis simétricas axosomáticas y axodendríticas desde los botones VIP. En conjunto, nuestros datos muestran que las células profundas de axón corto que contienen VIP forman una red que modula la función de otras interneuronas diferentes de las granulares. Esta red podría participar indirectamente en la inhibición o desinhibición de células principales o directamente en la generación de ritmos oscilatorios que sincronizasen poblaciones de interneuronas y por tanto de células principales. Nuestro estudio demuestra que la modulación local del BO es más compleja que la simple inhibición ejercida por parte de células periglomerulares y granulares, y remarca la importancia de considerar la contribución de otros tipos de interneuronas gabérgicas.

P 215

DESARROLLO DE LA INMUNORREACTIVIDAD A LA CALRETININA EN EL TELENCEFALO DE LA TRUCHA COMÚN

Castro AM^a, Becerra M^b, Manso MJ^a, Anadón R^b

^a Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de A Coruña.

^b Departamento de Biología Celular y Ecología, Universidad de Santiago de Compostela

La aparición y distribución de células y fibras inmunorreactivas a la calretinina (CR-ir) ha sido estudiada en el telencefalo de la trucha común (*Salmo trutta fario* L.) durante el desarrollo y etapa adulta, mediante la técnica inmunohistoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). Asimismo el empleo de *Western blotting* reveló la existencia de una banda proteica de 29 kDa, similar a la observada en rata. Los resultados obtenidos demuestran que esta proteína ligante de calcio tiene una amplia distribución en los hemisferios telencefálicos de la trucha, apareciendo la población CR-ir más temprana en el área ventral telencefálica de embriones de 7-8 mm de longitud. En embriones más desarrollados y en alevines, nuevas poblaciones CR-ir surgen en distintas regiones telencefálicas. El telencefalo precomisural muestra poblaciones CR-ir distribuidas dorsoventralmente en un patrón de bandas; tanto las poblaciones CR-ir dorsales como ventrales exhiben una distribución diferencial a lo largo del eje rostrocaudal. Asimismo puede observarse desde la etapa larvaria un patrón altamente específico de innervación por fibras CR-ir en la región dorsomedial del área telencefálica dorsal. Estos resultados indican la utilidad de esta proteína como marcador para el estudio de la organización del telencefalo de la trucha, sugiriendo además la implicación de la calretinina en funciones específicas durante el desarrollo del cerebro anterior.

Trabajo financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BXX2000-0453-C02-02) y la Xunta de Galicia (PGIDT99BIO20002).

P 216

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LAS CONEXIONES DEL CEREBELO EN EL SALMÓNIDO *ONCORHYNCHUS MYKISS*Folgueira M^a, Anadón R^b, Yáñez J^a^aDepartamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de A Coruña.^bDepartamento de Biología Celular y Ecología, Universidad de Santiago de Compostela

Hemos estudiado las conexiones del *corpus* y la válvula *cerebelli* en la trucha arcoiris (*Teleostei*) por medio del trazador neuronal DiI. Aplicaciones laterales de DiI al *corpus* (que podrían afectar en parte al lóbulo vestibulolateral) revelan bilateralmente neuronas aferentes, con predominio ipsilateral, principalmente en núcleos del pretecho, n. lateral de la válvula y un núcleo istmomesencefálico ventrolateral, así como en la gris central y formación reticular ístmica, área octavolateral, formación reticular inferior y, contralateralmente, en la oliva inferior. Las fibras eferentes cursan sobre todo contralateral y rostralmente desde el corpus por dos vías, lateral y medial. Las eferentes laterales alcanzan el toro longitudinal, un núcleo pretectal superficial dorsolateral (¿n. paracomisural?), y el toro semicircular. Las eferentes mediales inervan contralateralmente núcleos del tálamo, el n. del fascículo longitudinal medial y la región del n. rojo y tubérculo posterior, alcanzando algunas fibras el lóbulo inferior hipotalámico. Las aplicaciones de DiI en válvula revelan neuronas aferentes ipsilaterales en pretecho, n. óptico accesorio y n. lateral de la válvula, así como células reticulares dispersas y en la oliva inferior contralateral. Las eferentes valvulares cursan ipsilateralmente al tálamo, y bilateralmente al toro longitudinal, área pretectal, n. del fascículo longitudinal medial, áreas mesencefálicas dorsomediales y formación reticular istmorrombencefálica. Se analizan las posibles homologías con las conexiones cerebelosas descritas en otros peces actinoptergios. Trabajo financiado por el MCYT (BXX2000-0453-C02-01 y -02).

P 217

ANATOMÍA Y ESTRUCTURA DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN EN CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA1Herreras O^a, López-Aguado L^a, Zerda R^b, Álvarez F^b^aDpto. Investigación, Hospital Ramón y Cajal. Madrid.^bDpt. Anatomy, Wright State University. Dayton OH, USA

Las células piramidales de la región CA1 generan potenciales de acción tanto en axón como en dendritas. La geometría, excitabilidad y distancia eléctrica entre generadores determinan el sitio de inicio y modo de operación global. Conocer en detalle la anatomía y estructura del segmento inicial axónico es imprescindible para interpretar los resultados experimentales y en estudios teóricos. Hemos realizado este estudio en ratas Sprague adultas utilizando rodajas de hipocampo fijadas y también mantenidas *ex vivo*. Las neuronas piramidales se inyectaron con neurobiotina y posteriormente se inmunotifñeron con anticuerpos contra proteína básica de mielina. Tras revelado con avidina-fluoresceína e inmunorreactividad contra PBM, el material se analizó con microscopía confocal. Los heminodos se localizaron en el estrato *oriens*, próximos al *alveus*. Su distancia al cuerpo celular, estimada en proyección bidimensional de series de secciones ópticas, fue de 100-150 µm. El cono axónico se observa en la capa piramidal emergiendo tanto de somas como de dendritas primarias. El estudio ultraestructural del cono axónico y la región amielínica utilizó secciones seriadas procesadas para microscopía de transmisión convencional. En las reconstrucciones, asistidas por ordenador, el cono axónico mostró un diámetro de 2-2.5 µm y una longitud de 10-15 µm. A partir de éste, la región amielínica mantuvo un diámetro constante de 1-1.5 micras hasta el heminodo.

Financiado por PB98/1639 y BEFI02/1767.

P 218

CARACTERIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE CÉLULAS PERIGLOMERULARES QUE EXPRESAN CCK EN EL BULBO OLFATORIO DE LA RATACrespo C, Gutierrez-Mecinas M, Gracia-Llanes FJ, Blasco-Ibáñez JM, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ
Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia

En el cerebro de los vertebrados, los receptores olfatorios envían sus axones al bulbo olfatorio (BO), donde se produce el primer relevo de la información sensorial desde estos axones a la dendrita apical de las células principales. El relevo tiene lugar en unas estructuras particulares de neuropilo, los glomérulos olfatorios, y está modulado por una población de interneuronas conocidas como células periglomerulares (PG). Hasta ahora se ha considerado que las PG constituían una población homogénea de células gabérgicas que recibían contactos del nervio olfatorio. Pero investigaciones recientes han puesto de manifiesto que hay al menos dos grandes grupos de PG: las tipo 1, que son gabérgicas y reciben contactos del nervio olfatorio, y las tipo 2, que son GABA-negativas y no reciben aferencias sensoriales. Como parte de un proyecto de caracterización neuroanatómica y neuroquímica de PG, en este estudio nos hemos centrado en una población de PG que expresan el neuropéptido colecistoquinina (CCK) y de las que se desconoce si pertenecen al tipo 1 o al tipo 2. Para ello, hemos empleado la microscopía electrónica y dobles marcajes inmunocitoquímicos de CCK/calbindina, CCK/calretinina, CCK/somatostatina, CCK/tirosina hidroxilasa y CCK/GABA. El estudio aporta datos nuevos al conocimiento de la circuitería del BO encargada de modular la entrada de información sensorial desde la mucosa olfatoria y procesarla para elaborar una respuesta que será enviada a centros cerebrales superiores.

P 219

CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DE INTERNEURONAS EN EL BULBO OLFATORIO DE LA RATA: CÉLULAS PERIGLOMERULARES QUE EXPRESAN SOMATOSTATINA Y CÉLULAS PERIGLOMERULARES CON ACTIVIDAD NADPH-DIAFORASAGutiérrez-Mecinas M, Crespo C, Gracia-Llanes FJ, Blasco-Ibáñez JM, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ
Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia

El bulbo olfatorio (BO) es la primera estación de relevo de la información olfatoria. Este relevo se lleva a cabo en unas estructuras de neuropilo llamadas glomérulos olfatorios que aparecen delimitadas por interneuronas llamadas células periglomerulares (PG). Investigaciones recientes han descrito dos tipos de PG: las tipo 1 son gabérgicas y contactan con el nervio olfatorio y las tipo 2 no son gabérgicas, no reciben aferencias sensoriales y son positivas para calbindina D-28k (CB) y calretinina (CR). Existen subpoblaciones de PG de las que no se conoce ni su conectividad sináptica ni si pertenecen al tipo 1 o al tipo 2. Éste es el caso de las PG que expresan somatostatina (SOM) y de las que tienen la actividad enzimática NADPH-diaforasa (ND). La caracterización neuroquímica de estas PG podría ayudarnos a entender mejor cómo se modula el procesamiento de la información olfatoria. En este estudio se han hecho dobles marcajes inmunocitoquímicos de SOM/CB SOM/CR y SOM/GABA con fluorescencia. La ausencia de colocalización de estos marcadores demuestra que las PG que expresan SOM son un nuevo tipo de PG diferente de los previamente descritos. También se han realizado dobles marcajes histoquímicos/inmunocitoquímicos de ND/GABA que demuestran que todas las células ND-positivas son gabérgicas y por tanto de tipo 1. La caracterización neuroquímica hecha en este experimento muestra que la población de las PG es mucho más heterogénea de lo que se pensaba hasta ahora.

P 220**ANÁLISIS DEL ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN TANGENCIAL DE LA PROYECCIÓN TALAMOCORTICAL A LA CAPA I EN LA RATA ADULTA**

Rubio-Garrido JP, Pérez de Manzo F, Clascá F

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

Estudios en primates (Jones EG. TINS 2001; 24: 595) sugieren que una población neuronal específica, dispersa en la mayoría de los núcleos talámicos, originaría la proyección talamocortical a la capa I (TCI). Se atribuye a TCI un papel clave en procesos de sincronización de amplias áreas corticales. Hemos analizado el origen de TCI y su distribución tangencial sobre el hemisferio cerebral de la rata adulta. Utilizamos el transporte retrógrado de fluorocromos y trazado anterógrado con dextrano biotinilado.

Nuestros resultados muestran que sobre pequeñas zonas de la capa I de la corteza cerebral (aproximadamente 1 mm²) converge un número extraordinariamente elevado de axones talámicos. Estos axones proceden de neuronas situadas en múltiples núcleos a lo largo toda la extensión rostrocaudal del tálamo, especialmente en los núcleos anteriores, ventromedial, ventral lateral, ventral posteroinferior, lateral dorsal, geniculado lateral dorsal, lateral posterior, grupo posterior, parafascicular y regiones mediales del complejo geniculado medial. No observamos, sin embargo, neuronas TCI en los núcleos intralaminares anteriores, ni en los núcleos principales de los complejos ventral posterior y geniculado medial. El trazado anterógrado indica que pequeños grupos celulares TCI pueden inervar con sus axones gran parte de un hemisferio cerebral, y revela que sus arborizaciones terminales forman una tupida malla subpial, cuya distribución tangencial es heterogénea o «parcheada». Nuestros hallazgos clarifican el origen y el volumen de la proyección TCI en roedores. La elevada divergencia y convergencia del sistema TCI es congruente con su papel en la sincronización funcional de extensas regiones del hemisferio cerebral.

P 221**UTILIZACIÓN DE LA TOMOGRAFÍA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN (OCT) EN EL ESTUDIO DE LA CORTEZA CEREBRAL**Marín MC^a, Ahnelt P^b, Anger E^b, Bizheva K^c, Drexler W^c, Fernández E^a^a Instituto de Bioingeniería, Univ. Miguel Hernández. Alicante. ^b Institute of Physiology, Univ. Vienna. ^c Institute of Medical Physics, Univ. Vienna

El desarrollo de técnicas que permitan obtener imágenes de alta resolución de forma no invasiva, esta cobrando una gran importancia en los últimos años. Una de las técnicas con mayor interés, tanto a nivel clínico como experimental, es la tomografía óptica de alta resolución (*optical coherence tomography*, OCT). Aunque su mayor aplicación actual se da a nivel oftalmológico, existen también estudios en tejidos no transparentes. En este trabajo hemos utilizado la técnica OCT, para estudiar la estructura y morfología de la corteza cerebral de gatos en los que previamente se habían implantado microelectrodos intracorticales. Las muestras fueron fijadas y procesadas posteriormente mediante técnicas histológicas convencionales y técnicas de tomografía óptica de alta resolución. Nuestros resultados muestran que las técnicas de tomografía óptica son especialmente útiles para la visualización de las capas más externas de la superficie cerebral y permiten la reconstrucción tridimensional de la localización cerebral de los microelectrodos implantados. Este tipo de técnicas podrían ser de gran utilidad en el futuro para el estudio e investigación de la corteza cerebral. Subvencionado por el proyecto europeo CORTIVIS (QLK6-CT-2001-00279).

P 222**DISTRIBUCIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE ONS Y DE NADPH-d EN EL CLAUSTRO Y CORTEZAS ADYACENTES DE CONEJO**

Pró-Sistiaga P, Mendizábal-Zubiaga JL, Alejo A, Fuentes M, Bueno-López JL, Reblet C

Departamento de Neurociencias, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad del País Vasco

El óxido nítrico (ON) es un gas altamente difusible que actúa como mensajero intercelular. Recientemente se le ha atribuido un papel excitotóxico, provocando a altas concentraciones descargas epilépticas. Además, el claustró ha recibido atención debido a su relación con la propagación de descargas epilépticas tanto límbicas como temporales. En este estudio se planteó conocer la distribución en el claustró y cortezas adyacentes del conejo, de la enzima formadora de ON, la óxido nítrico sintetasa (ONS), y de la adenin nicotin dinucleótido fosfato reducida o NADPH-diaforasa, cofactor de la enzima.

El patrón de distribución de ambos marcadores fue similar, siendo disperso en el claustró y cortezas, aunque las células marcadas con NADPH-d se revelaron con mayor detalle que las ONS positivas. Realizamos una cuantificación del número de neuronas marcadas con estas técnicas, en relación al total de células marcadas con Nissl. Esta cuantificación mostró que el porcentaje de neuronas marcadas para ONS fue mayor que el obtenido para NADPH-d, tanto en el claustró como en sus cortezas adyacentes (diferencias significativas para $p < 0,001$ con el test Z de comparación de porcentajes). Estos porcentajes obtenidos, fueron también aproximadamente constantes en la distribución cortical laminar, en todas las capas que forman las cortezas, tanto insular como piriforme. Se puede inferir que no todas las neuronas ONS positivas son NADPH-d positivas, a diferencia de lo descrito anteriormente.

Proyectos 9/UPV/EHU 00212.327-12090 y MCT BSA2001-1179.

P 223**CARACTERÍSTICAS GEOMÉTRICAS Y TOPOLÓGICAS DE LAS NEURONAS: UN ESTUDIO EN RETINA DE VERTEBRADOS**Climent R^a, Bongard M^a, Ferrández JM^a, Ammermüller J^b, Kolb H^c, Fernández E^a^a Instituto de Bioingeniería, Univ. Miguel Hernández. Alicante.^b Department of Neurobiology, Univ. Oldenburg. Germany.^c John Moran Eye Center, Univ. Utah. USA

La retina es una estructura neural compleja, que contiene diversos tipos de neuronas interconectados con gran precisión, permitiendo un sofisticado procesamiento y codificación de la información visual antes de que ésta sea enviada a los centros cerebrales superiores. Es difícil encontrar un descriptor objetivo de los tipos celulares de la retina y un gran número de estas neuronas, especialmente a nivel de las capas más internas, continúan sin estar bien caracterizadas. El propósito de este trabajo es desarrollar una metodología que incorpore criterios geométricos y topológicos al análisis de las células de la retina, con el fin de facilitar la discriminación de diferentes tipos neuronales.

Se marcaron selectivamente 181 células de retina de tortuga mediante inyección intracelular de HRP, Neurobiotina o técnicas de Golgi. Estas células se digitalizaron con ayuda de una aplicación informática desarrollada en nuestro laboratorio. Los parámetros obtenidos de cada una de las células fueron introducidos en una base de datos y procesados con ayuda de redes neuronales y técnicas estadísticas multivariantes. Nuestros resultados sugieren que la incorporación de criterios geométricos y topológicos, a los parámetros morfológicos clásicamente utilizados (tamaño del cuerpo celular, estratificación y tamaño del árbol dendrítico, etc), facilita la discriminación de diferentes tipos neuronales a nivel de la retina.

Subvencionado por el proyecto europeo CORTIVIS (QLK6-CT-2001-00279).

P 224

VÍAS ANATÓMICAS DEL REFUERZO: AFERENCIAS PROSENCEFÁLICAS AL ÁREA VENTRAL TEGMENTAL EN RATONES

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

^aDepartament de Biologia Funcional i Antropologia Física.

^bDepartament de Biologia Cel·lular, Universitat de València

Los estímulos reforzantes parecen activar la vía dopaminérgica tegmental (VTA) al núcleo *accumbens*. Para explorar esta hipótesis analizamos las aferencias de la VTA del ratón inyectando trazadores neuroanatómicos potentes (dextranaminas). Estas inyecciones marcaron retrógradamente neuronas del córtex orbitofrontal, cingular, insular, perirrinal, motor y somatosensorial, del claustró, núcleo endopiriforme (End) y amígdala: área anterior amigdalina, núcleo del tracto olfatorio lateral (LOT), amígdala medial anterodorsal (MeAD), basomedial anterior y central. En el subcórtex la marca, era muy densa en núcleo *accumbens* (Acb), septo y núcleo de la banda diagonal, pálido ventral y globo pálido medial.

La densa marca de la *substantia innominata* y núcleo de la *stria terminalis* se extendía caudalmente en el hipotálamo preóptico medial (MPO) y lateral, área lateral hipotalámica (LHA) y núcleos paraventricular, anterior, dorsomedial, ventromedial (VMH) y perifornical (Pf). La zona *incerta* (ZI) y la habénula también mostraban marca.

Estas aferencias explicarían el carácter reforzante de olores (End, LOT) y feromonas (MeAD) o de comportamientos como el sexual (MPO, VMH), ingestivo (ZI, LHA) o de acicalado (Pf). Las conexiones recíprocas entre la VTA y el Acb sugieren que la estimulación del Acb por sus otras aferencias (especialmente amigdalinas y orbitofrontales) podría ser reforzante y activar, además, la vía tegmentoestriatal. Financiado por el MCYT y FEDER (BFI2001-3535).

P 225

EFFECTO DE LA HAPLOINSUFICIENCIA DE Dyrk1A EN RETINA DE RATÓN

Laguna A, Fotaki V, Martí E, Arbonés ML

Programa Genes y Enfermedad, Centre de Regulació Genòmica (CRG). Barcelona

DYRK1A es el homólogo del gen *minibrain* en *Drosophila* implicado en neurogénesis. *DYRK1A* se expresa de modo abundante y temprano en telencéfalo, retina neural y médula espinal. Recientemente, nuestro grupo ha descrito la implicación de este gen en el desarrollo del sistema nervioso central de ratón. Los cerebros de ratones con un alelo del gen mutado, *Dyrk1A*^{+/-}, presentan una reducción de tamaño significativa en mesencéfalo y rombencéfalo, siendo ésta especialmente notoria en el *tectum*. Los estratos *griseum superficialis* y *opticum* del colículo superior, que contienen aferencias retinotectales, se encuentran también severamente disminuidos. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo que se planteó en este estudio fue analizar la morfología de la retina en ratones adultos deficientes en *Dyrk1A*. Estos ratones no mostraron alteraciones ni en la morfología celular ni en la organización laminar respecto a los controles *Dyrk1A*^{+/+}. Tampoco se observaron diferencias en el grosor de las capas nuclear y plexiforme externas. Por el contrario, las capas nuclear y plexiforme internas en retinas *Dyrk1A*^{+/-} presentaron una reducción de grosor significativa. El recuento de células en retinas de ambos genotipos indicó densidades neuronales semejantes en las capas nucleares observándose, sin embargo, una disminución de la celularidad en la capa ganglionar de ratones *Dyrk1A*^{+/-}. El análisis inmunohistoquímico utilizando marcadores de diferentes subpoblaciones neuronales y de glia de Müller reveló una reducción en el número de células bipolares y amacrinas en retinas *Dyrk1A*^{+/-}. Estudios preliminares realizados en estadíos perinatales sugieren que las alteraciones observadas son debidas a un defecto durante el neurodesarrollo de la retina.

P 226

DISTRIBUCIÓN DE CALBINDINA Y CALRETININA EN EL TELENCÉFALO DEL CONDRÓSTEO, ACIPENSER BAERI, BRANDT

Huesa G^a, Graña P^b, Anadón R^c, Yáñez J^b

^aDepartment of Cellular and Structural Biology, Univ. Colorado, USA.

^bDepartamento de Biología Celular y Molecular. Univ. de A Coruña.

^cDepartamento de Biología Celular y Ecología. Univ. de Santiago de Compostela

Los condrosteos son uno de los representantes actuales de los peces óseos primitivos no teleosteos. El telencéfalo de los condrosteos presenta eversión moderada y ha sido subdividido en diferentes regiones, cuya nomenclatura se asemeja a la descrita para los teleosteos. A pesar de ello existen algunas divergencias en la interpretación de dichas áreas entre distintos autores. Con el fin de mejorar la caracterización de éstas, hemos utilizado como criterio la distribución de la inmunorreactividad a la calbindina (CB) y la calretinina (CR) en el telencéfalo de *Acipenser baeri*. Ambas proteínas ligantes de calcio están presentes principalmente en las células granulares del bulbo olfatorio, al igual que en las regiones previamente identificadas como área central del telencéfalo dorsal (Dc), y área dorsal del telencéfalo ventral (Vd). En la región posterior del telencéfalo ventral (Vp) hay un fuerte predominio de células positivas a la CR. En la porción caudomedial del telencéfalo dorsal (Dm) hay también numerosas neuronas y procesos CR inmunorreactivos. Las neuronas inmunorreactivas a la CB se encuentran algo más dispersas en el telencéfalo, localizándose principalmente concentradas en las regiones periventriculares ventrales (Vv) y dorsales (Vd, Vn) del telencéfalo ventral. La distribución de la inmunorreactividad a la CB y CR en las diferentes áreas telencefálicas será analizada a la luz de los datos citoarquitectónicos provenientes de tinciones de Nissl y de acetilcolinesterasa en la misma especie. Trabajo financiado por el MCYT (BXX2000-0453-C02-01 y -02).

P 227

ESTUDIO DEL EPITELIO EPENDIMARIO HUMANO Y SUS ALTERACIONES EN CASOS DE HIDROCEFALIA

Domínguez MD^a, Páez P^a, Rodríguez-Pérez LM^a, Tomé M^a, Weil B^b, Jiménez A^a, Arráez MA^c, Pérez-Fígares JM^a

^aDepartamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. ^bServicio de Anatomía Patológica, Hospital Carlos Haya, Málaga.

^cServicio de Neurocirugía, Hospital Carlos Haya, Málaga

Las células ependimarias recubren las cavidades ventriculares del SNC, constituyendo la barrera cerebro-líquido cefaloraquídeo. Estas células carecen de capacidad regenerativa y su daño, sea experimental o patológico, desencadena un proceso de reacción astrogliar que culmina con la formación de una nueva barrera que tapiza la superficie ventricular dañada. En el presente trabajo se ha estudiado el epitelio ependimario de 9 casos diagnosticados de hidrocefalia de tipo comunicante y distinta etiología. El rango de edades estaba comprendido entre las 16 semanas prenatales y los 3 meses posnatales. Igualmente se han estudiado 12 controles en el mismo rango de edad. Las superficies ventriculares estudiadas corresponden a: ventrículo lateral, tercer y cuarto ventrículo y canal central de la médula espinal. Se han utilizado técnicas inmunocitoquímicas para distintos marcadores celulares, glucocalix y filamentos intermedios, así como luxol fast blue como marcador de mielina. En los nueve casos de hidrocefalia investigados y, a pesar de su diferente etiología, el hecho común observado ha sido la presencia de amplias zonas de superficie ventricular carentes de epéndimo y, posiblemente relacionadas con ellas, otras alteraciones, tales como aumento de macrófagos, edema periventricular, gliosis astrocitaria, alteraciones de la mielina e infiltrados linfocitarios.

Financiación: FIS- 01-0948; Red Cien, Instituto de Salud Carlos III; Servicio Andaluz de Salud.

P 228**DESARROLLO POSNATAL DE LOS CIRCUITOS RICOS EN ZINC DE LA CORTEZA CEREBRAL: ORGANIZACIÓN LAMINAR Y EN COLUMNAS**

Miró-Bernié N, Pérez-Clausell J

Departament de Biologia Cel.lular, Universitat de Barcelona

Existe un subgrupo de neuronas glutamatérgicas en cuyos terminales encontramos zinc asociado a las vesículas sinápticas. Estos botones ricos en zinc (ZN+) son abundantes en la corteza cerebral, donde presentan una distribución horizontal y vertical muy característica (en láminas y columnas). Los botones ZN+ aparecen en el periodo posnatal. Nuestro estudio analiza la aparición de esta organización horizontal y vertical durante el desarrollo. Se utilizaron ratas con edades comprendidas entre P0 y P21. Se les inyectó selenito sódico (15 mg/kg intraperitoneal) y se sacrificaron al cabo de 1 hora. El selenito precipita con el zinc de los botones y se pone de manifiesto mediante el revelado (amplificación con plata) de los cortes histológicos. Los resultados mostraron que la aparición de terminales ZN+ seguía un gradiente de desarrollo desde dentro hacia afuera (de la sustancia blanca a la superficie pial) durante las 2 primeras semanas posnatales. Cabe destacar un marcado transitorio intenso de la capa IV de los postnatales, la cual presenta, en adultos, una gran escasez de botones ZN+. Así mismo, en cortes tangenciales de la corteza, se observó la distribución en mosaico de los botones ZN+ en la corteza somatosensorial (*barrels*) visual y auditiva. El mosaico definido por los botones ZN+ probablemente refleja la organización columnar de la corteza. La distribución de los botones ZN+ puede verse afectada por la actividad neuronal, especialmente durante periodos críticos del desarrollo (Land PW, Shamalla-Hannah L, 2002), por lo que el mosaico de botones ZN+ aquí descrito puede ser determinante en la construcción de la organización cortical tanto en estados normales como en ausencia de estímulos sensoriales.

Financiado por FIS 01/0096-02.

P 229**DISTRIBUCIÓN DE LAS AFERENCIAS PROSENCEFÁLICAS EN EL TECHO ÓPTICO DE LARVAS PREMETAMÓRFICAS DE *PETROMYZON MARINUS***

De Arriba MC, Rodríguez-Alonso M, Pombal MA

Área de Biología Celular, Dpto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo

En el techo óptico (TO) se produce la integración de distintos tipos de información sensorial. Sin embargo, la distribución de las aferencias tectales no es homogénea a lo largo de toda su extensión. En este trabajo hemos realizado inyecciones unilaterales con BDA en tres niveles diferentes del TO (rostral, medial y caudal).

Los resultados demuestran que las poblaciones prosencefálicas que proyectan al TO lo hacen bilateralmente, siendo mayor el número de células ipsilaterales. Las proyecciones desde el palio y la pineal no alcanzan el TO caudal. Lo mismo sucede para algunos núcleos talámicos (Bellonci y geniculad ventral), aunque se marcan algunas neuronas periventriculares dorsalmente en el tálamo dorsal desde el TO caudal. Las células pretectales son muy numerosas tanto ipsi como contralateralmente. Los núcleos magnocelular y parvocelular de la comisura posterior se marcan desde el TO rostral y medial. Además, algunas células magnocelulares alcanzan el TO caudal. La mayoría de las aferencias tectales con origen en la placa basal prosencefálica terminan en la región rostral o medial del TO, excepto unas pocas células del tubérculo posterior que proyectan al TO caudal.

Estos resultados demuestran que las proyecciones prosencefálicas al TO alcanzan distintos niveles rostrocaudales pudiendo, por tanto, participar en la activación de diferentes tipos de neuronas eferentes tectales.

Financiación: CICYT (PM99-0072), Xunta de Galicia (PGIDT00 PXI30112PR) y Universidad de Vigo.

P 230**LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL NEUROPEPTIDO FF EN EL SNC DE LA LAMPREA**Pombal MA^a, Morona R^b, Rodríguez-Alonso M^a, López JM^b,De Arriba MC^a, Moreno N^b, Álvarez-Otero R^a, González A^b^aÁrea Biología Celular, Dpto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Univ. de Vigo. ^bDpto. Biología Celular, Univ. Complutense de Madrid

El neuropéptido FF (NPFF) es un octapéptido perteneciente a la familia de los péptidos relacionados con las RFamidas. Su distribución ha sido estudiada en varias especies de mamíferos y de anfibios. En este trabajo estudiamos su distribución en el SNC de la lamprea de mar adulta.

La mayor parte de las células inmunorreactivas se localizan en el prosencéfalo secundario y en la región ístmica. Las poblaciones positivas en el prosencéfalo secundario se localizan mayoritariamente en el hipotálamo. En el diencéfalo solamente aparecen algunas células positivas en la pineal y en el mesencéfalo una población a nivel tegmental. En la región ístmica hay dos poblaciones, una dorsal formada por una banda de células colocada horizontalmente, y otra ventral en la formación reticular. Más caudalmente hay células marcadas en el núcleo sensitivo del nervio trigémino y en el núcleo del tracto solitario. Las fibras son muy abundantes en la placa basal, sobre todo en el septo, estriado, hipotálamo y regiones tegmentales más caudales. En la médula espinal son más abundantes lateralmente a las columnas dorsales.

Estos resultados demuestran la existencia de un patrón de inmunorreactividad que coincide sólo parcialmente con los previamente publicados para otros péptidos de la familia de las RFamidas, lo cual sugiere la presencia de NPFF en el SNC de lampreas.

Financiación: CICYT (PM99-0072), Xunta de Galicia (PGIDT00 PXI30112PR) y Universidad de Vigo (MAP), y DGICYT (BOS2000-0559) (AG).

P 231**ESTUDIO COMPARADO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS TRES SUBUNIDADES DE NEUROFILAMENTOS EN LAS CÉLULAS GANGLIONARES DE LA RETINA HUMANA Y PORCINA**Ruiz-Ederra J^a, García M^a, Hernández M^a, Urcola J^a,Hernández-Barbáchano E^a, Araiz J^b, Durán J^b, Vecino E^a^aDepartamento de Biología Celular e Histología. ^bDepartamento de Oftalmología, Universidad del País Vasco

Los neurofilamentos (NFs) son el componente principal del citoesqueleto de las células ganglionares de la retina (CGR). El citoesqueleto se ve afectado en enfermedades neurodegenerativas como el glaucoma. La retina del cerdo presenta características similares a la humana y la ventaja de poder identificar todas las CGR mediante el trazado retrógrado con fluorogold. Por ello, en el presente trabajo analizamos la distribución de las subunidades de bajo, medio y alto peso molecular de los neurofilamentos (NF-L, NF-M y NF-H) en las CGR humana y porcina. Se examinaron retinas teñidas con anticuerpos contra las tres subunidades. Además se utilizaron anticuerpos que reconocen tanto la subunidad NF-H fosforilada (NF-Hp), como anticuerpos contra NF-H fosforilados y no fosforilados (NF-H). Se observó que las subunidades NF-M y NF-H se distribuyen de forma homogénea por todas las CGR, tanto en el soma como en el axón y en las dendritas. La subunidad NF-L se encuentra en axón y en dendritas, pero en el soma su localización es ligeramente más perinuclear que NF-M y NF-H. La distribución de la subunidad NF-Hp varía con la zona de la retina estudiada. Así, está presente en axones y dendritas de todas las CGR pero además se expresa en el soma de algunas RGCs de la periferia. La distribución de las distintas subunidades de los neurofilamentos es muy similar en las CGR humana y porcina.

Financiación: Comunidad Europea (ProAgeRet QLK6-2000-00569) y Universidad del País Vasco (1/UPV00075.327-E14887/2002).

P 232**EFFECTO DE LA PILOCARPINA SOBRE LAS NEURONAS GRANULARES EN EL HIPOCAMPO DE RATÓN: ¿NEUROGÉNESIS REACTIVA?**

Marqués-Marí AI, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Gracia-Llanes FJ, Martínez-Guijarro FJ

Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia

En el hipocampo de ratón, la pilocarpina (PC) induce un estado epiléptico que provoca la pérdida de células musgosas en el hilus del giro dentado y un aumento de células granulares positivas para calretinina (CR).

En ratón la CR es un marcador de células granulares inmaduras, por lo cual, el gran incremento en número de éstas tras la lesión lleva a pensar en un aumento de la proliferación. Sin embargo, su aparición es demasiado rápida como para que sea debida a una neurogénesis reactiva, ya que en animales control las neuronas granulares no son CR hasta 5 días después de su generación. Este hecho, por tanto, plantea la duda de si se trata realmente de neurogénesis reactiva, o más bien de una reexpresión de marcadores propios de granulares inmaduras por parte de neuronas ya existentes con anterioridad a la lesión.

Para establecer el momento de la génesis de estas granulares CR, hemos inyectado un marcador de proliferación celular (BrdU) con anterioridad a la inducción de lesión con PC.

Los resultados obtenidos nos llevan a la conclusión de que estas neuronas granulares se generaron poco antes de la lesión. Es muy posible que los cambios ocurridos en la circuitería del hipocampo afecten a la expresión de CR y al proceso normal de maduración de estas neuronas granulares relativamente jóvenes.

P 233**CONEXIONES ENTRE EL NÚCLEO VENTRAL DEL CUERPO TRAPEZOIDE Y LAS NEURONAS DE LA RAÍZ COCLEAR: POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA INHIBICIÓN POR ESTÍMULO PREVIO DEL REFLEJO AUDITIVO DE SOBRESALTO**

Nieto RG, López DE

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

Un estímulo acústico inesperado o de gran intensidad produce en los mamíferos una serie de reacciones de alarma que se engloban en el llamado reflejo auditivo de sobresalto (RAS). El RAS incluye una respuesta motora refleja y una gran variedad de manifestaciones del sistema nervioso autónomo.

El circuito principal del reflejo auditivo de sobresalto está formado por las neuronas de la raíz coclear (NsRC), el núcleo reticular pontino caudal (NRPC) y las motoneuronas correspondientes.

La inhibición por estímulo previo (IEP) es un descenso de la amplitud de respuesta del RAS provocado por un estímulo acústico no desencadenante del reflejo. Lógicamente, alguno de los núcleos auditivos debe sinaptar sobre las NsRC o el NRPC modulando el circuito del RAS. Aunque muchos autores consideran al NRPC como el núcleo sobre el que se realiza esa modulación, trabajos previos en nuestro laboratorio apuntan a las NsRC como responsables de la IEP.

Inyectando un trazador retrógrado en la raíz coclear encontramos somas marcadas en el núcleo ventral del cuerpo trapezoide (NVCT).

Para confirmar la conexión de este núcleo con las NsRC, depositamos un trazador anterógrado, dextrano biotinado, en el NVCT. Tras 10 días de supervivencia, perfundimos al animal, seccionamos el cerebro coronalmente y procesamos las secciones por el método ABC estándar para visualizar el trazador. Los resultados obtenidos corroboran la existencia de una proyección bilateral del NVCT sobre las neuronas de la raíz coclear. Esta conexión podría ser un elemento importante del substrato anatómico responsable de la inhibición por estímulo previo del reflejo auditivo de sobresalto.

Financiado por los proyectos FIS PI021697, JCyL/FSE: SA 084/01 y BFI 2000-1396.

P 234**ESTUDIO MULTITÉCNICO DE LOS TIPOS NEURONALES DE LA COLUMNA COMISURAL TECTAL**

Aparicio MA, Viñuela A, Malmierca MS, Saldaña E

Laboratorio de Neurobiología de la Audición, Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL), Universidad de Salamanca

La columna comisural tectal (CCT) es un núcleo largo y delgado que recorre longitudinalmente el techo mesencefálico, desde el extremo caudal de la comisura del colículo inferior, hasta el extremo rostral de la comisura del colículo superior. Hemos aplicado diversos métodos neuromorfológicos para caracterizar sus tipos neuronales.

Con los métodos de Nissl y Golgi se reconocen dos tipos diferentes que se entremezclan por el núcleo. Las neuronas de tipo I posee soma redondeado y mediano o pequeño; sus escasas dendritas son lisas y poco ramificadas. Las neuronas de tipo II, menos abundantes, son algo mayores, de soma poligonal y con árboles dendríticos más complejos. En los dos tipos el axón suele nacer de una dendrita primaria.

Las reconstrucciones tridimensionales con el programa Neurolucida revelan que la mayoría de los árboles dendríticos son aplanados y se disponen en un plano aproximadamente coronal. Su forma suele estar condicionada por las relaciones con los fascículos de fibras de las comisuras intercoliculares.

Ninguno de los dos tipos neuronales se marca con técnicas histoquímicas (acetilcolinesterasa, NADPH-diaforasa) o inmunocitoquímicas (parvalbúmina, calbindina, calretinina) comunes. Sin embargo, aproximadamente el 65% de las neuronas de la CCT se marcan retrógradamente al inyectar FluoroGold en el complejo olivar superior ipsolateral, y estas neuronas tectoolivares pertenecen a ambos tipos neuronales.

Financiación: MCyT (BFI 2000-1358), JCyL (SA 079/01).

P 235**NEURONAS GABÉRGICAS DE LA COLUMNA COMISURAL TECTAL DE LA RATA**

Viñuela A^a, Berrebi AS^b, Saldaña E^a

^aLaboratorio de Neurobiología de la Audición, Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL), Universidad de Salamanca. ^bDepartamentos de Otorinolaringología y Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad de West Virginia, Morgantown, USA

Hemos analizado con ratas albinas la distribución de las neuronas inhibitorias de la columna comisural tectal (CCT), un núcleo mesencefálico de gran tamaño descubierto recientemente. Para ello, detectamos los neurotransmisores GABA y glicina (Gly) mediante inmunocitoquímica en secciones semifinas adyacentes. También detectamos la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), que sintetiza el GABA, con inmunocitoquímica en secciones gruesas flotantes usando sendos antisueros contra sus isoformas de 65 kDa y de 67 kDa, o un tercer antisuero que reconoce ambas isoformas.

Apenas hallamos somas inmunorreactivos (IR) para Gly (IR-Gly), y los botones IR-Gly fueron también muy escasos. Sí encontramos muchas neuronas IR-GABA y, con todos los antisueros ensayados, las somas IR-GAD representaron más del 50% de todas las neuronas de la TCC. Estas neuronas gabérgicas no muestran ninguna distribución preferente dentro del núcleo. Los botones IR-GABA abundan por toda la CCT y muchos rodean a somas inmunopositivos o inmunonegativos.

Como en la CCT predominan las neuronas de proyección, estos datos sugieren que este núcleo participa en la modulación precisa de los núcleos inervados por él, y que puede intervenir, por tanto, en la modulación de algún tipo de integración multisensorial o sensoriomotora.

Financiado por: MCyT (BFI 2000-1358), JCyL (SA 079/01) y BEFI 00/9418.

P 236**LOS ESTÍMULOS AUDITIVOS Y VISUALES INDUCEN EXPRESIÓN DE C-FOS EN LA COLUMNA COMISURAL TECTAL DE LA RATA**

Castellano O, Viñuela A, Malmierca MS, Saldaña E

Laboratorio de Neurobiología de la Audición, Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL), Universidad de Salamanca

Para ampliar la caracterización morfofuncional de la columna comisural tectal (CCT) de la rata, hemos analizado la expresión del gen c-fos en respuesta a estímulos auditivos o visuales. Hemos usado métodos inmunocitoquímicos para detectar la proteína Fos y métodos estereológicos para calcular el número de neuronas inmunorreactivas (IR-Fos).

Varias ratas (grupo 1) fueron sacrificadas tras 72 h en silencio y en la oscuridad y sirvieron como control de la expresión basal de la proteína Fos. Tras un aislamiento similar, otras ratas (grupo 2) fueron expuestas a estimulación con ruido blanco (1-20 kHz, 60-80 dB) durante 2 h en la oscuridad, mientras que otras (grupo 3) fueron expuestas a destellos de luz blanca (frecuencia >1 Hz) durante 2 h en silencio.

En todos los animales hallamos neuronas IR-Fos repartidas por la CCT. En los animales de control (grupo 1), más del 10% de las neuronas fueron IR-Fos. En los animales estimulados acústicamente (grupo 2) o visualmente (grupo 3) el porcentaje de neuronas IR-Fos fue de más del 55% y más del 40%, respectivamente.

El notable incremento en el número de neuronas IR-Fos en los animales estimulados acústicamente sugiere que la CCT participa en algún aspecto del procesamiento auditivo aún no identificado. Además, la activación de neuronas de la CCT por estímulos visuales sugiere que este núcleo interviene en fenómenos de integración multisensorial o sensoriomotora.

Subvencionado por: MCyT (BFI 2000-1358) y JCyL (SA 079/01 y SA034/01).

P 237**CITOARQUITECTURA DE LOS NÚCLEOS COCLEARES DEL PRIMATE MACACA FASCICULARIS**Saldaña E^a, Cervera-Paz F^b, Manrique M^b*^aLaboratorio de Neurobiología de la Audición, Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL), Universidad de Salamanca. ^bDpto. de Otorrinolaringología, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra*

En las personas totalmente sordas por el daño de ambos nervios cocleares, la única esperanza de recuperar parte de la función auditiva son los implantes auditivos troncoencefálicos (IATE), con los que se estimulan directamente los núcleos cocleares (NCo). Antes de utilizar el mono *Macaca fascicularis* como un modelo experimental para el ensayo de IATE, hemos realizado un estudio anatómico e histológico sistemático de sus NCo. Con métodos estereológicos hemos calculado el volumen y número de neuronas de estos núcleos, y hemos caracterizado la morfología y distribución de sus neuronas con métodos histoquímicos clásicos (Nissl y acetilcolinesterasa) y con antisueros contra calbindina, parvalbúmina, calretinina y neurofilamentos (SMI32).

La organización general de los NCo del *M. fascicularis* es similar a la de otros primates y, por extensión, a la de otros mamíferos. Sus principales tipos neuronales magnocelulares se parecen, por su forma y distribución, a los descritos en otras especies. Como observaciones significativas, pueden mencionarse la existencia de una capa superficial de granos gruesa y bien delimitada, no común en otros primates evolucionados, la presencia de neuronas unipolares en pincel, y la abundancia de neuronas de Purkinje ectópicas.

Estos datos servirán de base para analizar los efectos en la organización de los NCo causados por la sección quirúrgica del nervio coclear.

Financiación: MCyT (BFI 2000-1358), JCyL (SA 079/01).

Neurofarmacología**P 238****VÍAS DE MUERTE APOPTÓTICA EN CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA**Verdaguer E^a, Jordà EG^a, Sureda FX^b, Jiménez A^a, Rimbau V^a, Canudas AM^a, Camins A^a*^aUnitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.**^bUnitat de Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili*

La muerte neuronal por apoptosis se ha descrito en muchas enfermedades neurodegenerativas. Se ha realizado un estudio de las distintas señales apoptóticas inducidas al tratar las células granulares de cerebelo (CGC) con colchicina, ácido kaínico (KA) o privación de suero y potasio (DV). En los tres modelos se observa la expresión de señales proapoptóticas como el Par-4 y liberación mitocondrial de citocromo C. Con KA y DV observamos la expresión de proteínas del ciclo celular, ciclinas, ciclinas dependientes de cinasas (CDK) entre ellas CDK2, CDK4. En estos dos modelos se ha demostrado la entrada en fase S del ciclo celular por incorporación de bromodeoxiuridina y la expresión del factor de transcripción E2F-1 que es liberado de la proteína del riboblastoma y que en células quiescentes es capaz de inducir apoptosis. Por otra parte la muerte apoptótica inducida por colchicina no parece relacionada con la entrada en ciclo celular. La CDK5 es una CDK no implicada en ciclo celular, su desregulación contribuye en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, ya que uno de sus primeros sustratos identificados es la proteína tau. En CGC tratadas con colchicina 1 µM durante 24 h demostramos un aumento en la expresión de CDK5.

El estudio comparativo de estos tres modelos nos muestra que la muerte apoptótica en CGC se puede producir por diferentes vías, ya sea por una sobreexpresión de CDK5 y la consiguiente alteración del citoesqueleto celular, como sucede tras la adición de colchicina, o bien la entrada en ciclo celular, caso de someter las células a DV o a un tratamiento con KA. En ambos casos se observa, la implicación de las cinasas dependientes de ciclina en los diversos modelos.

Trabajo financiado por SAF 2002-079, FISS G03/137 y FISS G03/167.

P 239**LOCALIZACIÓN DEL PBR EN CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA**

Jordà EG, Verdaguer E, Jiménez A, Morano A, Canudas AM, Camins A, Pallàs M

Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

El receptor benzodiazepínico periférico (PBR) se encuentra en la membrana mitocondrial y está colocalizado con el poro de transición mitocondrial. Una de las principales funciones biológicas del PBR es la regulación de la apoptosis. En este trabajo hemos estudiado la implicación de ligandos específicos del PBR, Ro5-4864 (Ro) y PK11195 (PK), sobre la apoptosis inducida por colchicina (CX) en células granulares de cerebelo de rata, y la localización de este receptor en las mitocondrias neuronales. La viabilidad celular fue evaluada por la técnica de MTT, y observamos cómo la neurotoxicidad inducida por CX 1 µM aumentaba de forma dosis dependiente y significativa al cotratarse las células durante 24 h con Ro (25 y 50 µM) y PK (25 y 50 µM). En cambio, cuando los cultivos celulares fueron pretratados 24 h antes con z.VAD.fmk (100 µM), inhibidor de caspasas, revertía totalmente los efectos neurotóxicos inducidos en este modelo. Las técnicas de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia nos mostraron como los ligandos del PBR potenciaban la apoptosis inducida por CX. Hemos descrito la activación de la caspasa-3 por CX. El cotratamiento con los ligandos específicos del PBR, también produjeron una potenciación de la actividad de esta proteasa. Estos resultados nos llevaron a pensar en la existencia del PBR en neuronas, ya que hasta el momento se creía localizado únicamente en microglía. Mediante técnicas

inmunocitoquímicas y de unión con ligandos fluorescentes demostramos la localización del PBR en las mitocondrias de células granulares. Trabajo financiado por SAF 2002-079, FISS G03/137 Y FISS G03/167.

P 240

ACCIÓN NEUROPROTECTORA DEL LITIO EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR COLCHICINA EN CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO DE RATA

Morano A, Jordà EG, Verdager E, Jiménez A, Canudas AM, Pallàs M, Camins A

Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

Algunas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por alteraciones neuronales del citoesqueleto. En este trabajo hemos utilizado la colchicina como modelo para provocar la alteración del citoesqueleto en cultivos de células granulares de cerebelo (CGC) de rata. El litio es uno de los fármacos más usados en el tratamiento y profilaxis de los trastornos bipolares. En el presente estudio hemos valorado los efectos neuroprotectores de este fármaco en el modelo de apoptosis inducida por colchicina. Se han evaluado los efectos de la adición de litio (1-5 mM) a los cultivos de CGC 24 h antes de ser tratadas con colchicina (1 μ M) durante 24 h. La acción neuroprotectora del litio resultó ser dosisdependiente valorándose por MTT. Asimismo, los estudios por citometría de flujo demostraron una reducción significativa del número de células apoptóticas en los cultivos tratados con litio. El litio también redujo de forma significativa el porcentaje de núcleos apoptóticos evaluados por microscopía de fluorescencia. Al pretratar con Li 5 mM se observó una reducción significativa de la actividad caspasa-3 inducida por colchicina 1 μ M. Se valoró por *Western blot* la expresión de la CDK5 inducida por colchicina, ya que la CDK5 es una ciclin cinasa que fosforila el citoesqueleto. La inhibición en la expresión de la CDK5 observada en presencia de litio, permite hipotetizar que uno de los mecanismos de protección del litio es a través de la CDK5. Trabajo financiado por SAF 2002-079, FISS G03/167 y FISS G03/137.

P 241

EFFECTOS PROTECTORES DE 1400W, INHIBIDOR DE NOS INDUCIBLE, EN RATAS SOMETIDAS A ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

Salom JB ^{a,b}, Lizasoain I ^c, Castillo J ^d, Dávalos A ^e, Pérez-Asensio FJ ^a, Hurtado O ^c, Burguete MC ^a, Torregrosa G ^{a,b}, Moro MA ^c, Alborch E ^{a,b}

^a Centro de Investigación, Hospital La Fe, Valencia. ^b Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia. ^c Departamento de Farmacología, Universidad Complutense de Madrid. ^d Servicio de Neurología, Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. ^e Servicio de Neurología, Hospital Universitario Dr. Trueta. Girona

La expresión de NO sintetasa inducible (iNOS) y la consiguiente sobreproducción de NO se considera un factor agravante de la isquemia cerebral y, por lo tanto, su inhibición selectiva podría resultar beneficiosa. Utilizando dos modelos de isquemia cerebral focal (transitoria y permanente), se han analizado los efectos de 1400W, inhibidor selectivo de iNOS, sobre los siguientes parámetros: L-Arg sérica, volumen de infarto (medido con TTC), pérdida de peso corporal y deterioro neurológico-funcional.

La isquemia permanente provocó reducción en la concentración sérica de L-Arg, máxima a las 6 h, se mantuvo a las 24 h y revirtió a las 48 h. Tras 72 h de isquemia, el volumen de infarto fue de 128 ± 9 mm³ (20 $\pm$ 1% del hemisferio).

La isquemia transitoria (90 min) produjo a las 72 h un volumen de infarto de 197 ± 33 mm³ (29 $\pm$ 5% del hemisferio), pérdida de peso hasta el $81 \pm 2\%$ del basal y deterioro funcional ($3,4 \pm 0,5$ puntos, escala 0-9).

El tratamiento con 1400W (2,5 mg/kg/h, SC en isquemia permanente e IP en transitoria) resultó en una menor reducción de L-Arg sérica

($p < 0,05$), menor volumen de infarto (46% del control en isquemia permanente, $p < 0,05$, y 59% en transitoria, $p = 0,059$), y mejor valoración funcional ($2,0 \pm 0,4$, $p < 0,05$).

Los resultados indican que la activación de iNOS tras isquemia cerebral se refleja en la reducción sérica de sustrato L-Arg. La inhibición selectiva de iNOS resulta beneficiosa en términos de actividad iNOS, tamaño de infarto y resultado funcional.

P 242

PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS EN LA MODULACIÓN DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOCORTICAL. EFECTO DE FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS ATÍPICOS

Scorza MC, Díaz-Mataix L, Bortolozzi A, Celada P, Artigas F

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

Las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (ATV) proyectan hacia la corteza prefrontal (CPF) (vía mesocortical). A su vez, las neuronas piramidales de la CPF medial (CPFm) proyectan hacia la ATV. En el presente trabajo hemos estudiado la modulación de la vía dopaminérgica mesocortical por receptores 5-HT_{2A} de CPFm, presentes en neuronas piramidales, ya que su bloqueo contribuiría a la actividad clínica de los antipsicóticos atípicos. La aplicación local del agonista 5-HT_{2A/2C} DOI aumentó la liberación *in vivo* de dopamina (DA) en CPFm (efecto sensible a TTX) y en ATV. Asimismo, la administración sistémica de DOI aumentó la liberación de DA en CPFm y en ATV, acompañándose de un aumento significativo del porcentaje de descarga en ráfagas de las neuronas dopaminérgicas de ATV. El efecto del DOI sobre la liberación de DA está mediado por receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} ya que se revirtió con antagonistas selectivos (M100907 y SB242084, respectivamente). Asimismo, el agonista 5-HT_{2C} Ro 60-0175 aumentó la liberación de DA. El agonista 5-HT_{1A}, BAY x 3702, revirtió el efecto de DOI, mostrando que dichos receptores modulan la liberación de DA en CPFm de forma opuesta a los 5-HT_{2A}. Por otra parte, los antipsicóticos atípicos, olanzapina y clozapina revirtieron el aumento de DA inducido por la aplicación local de DOI en CPFm. Estos resultados sugieren que existe un importante control serotoninérgico sobre la vía mesocortical dopaminérgica.

P 243

AUTOESTIMULACIÓN DE LA CORTEZA PREFRONTAL: UN MODELO CONDUCTUAL PARA DISCRIMINAR LA ATIPICIDAD DE LOS NUEVOS FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS

Montes R, Chaatouf EH, Ferrer JMR

Instituto de Neurociencias y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

El haloperidol, prototipo de antipsicótico típico (AT), produce severos efectos extrapiramidales, mientras la clozapina, prototipo de antipsicótico atípico (AA), no los produce. Los nuevos antipsicóticos parcialmente muestran la atipicidad de la clozapina. Aunque se desconoce la base farmacológica de la atipicidad, para algunos autores se debe a la mayor actividad antagonista sobre los receptores 5-HT_{2A} en comparación con los D₂ y para otros a la unión lábil con los D₂. Por otro lado, se ha descrito que los AT producen descensos intrasesión (DIS) en conductas operantes. Se ha estudiado la producción de DIS en la conducta de autoestimulación obtenida en la corteza prefrontal (CPF) de la rata de 2 AT (haloperidol, pimozida) y 6 AA (clozapina, ziprasidona, olanzapina, setoperona, sertindol, risperidona). Los resultados muestran que los AT inducen DIS, mientras que los AA no los inducen (clozapina, ziprasidona), lo hacen en menor grado (setoperona, olanzapina, sertindol) o presentan efectos similares a los AT (risperidona). Considerando la magnitud de los DIS, los antipsicóticos muestran el siguiente orden de mayor a menor efecto: pimozida, risperidona, haloperidol, sertindol, setoperona, olanzapina,

ziprasidona, clozapina. Este orden se corresponde con el grado creciente de labilidad en la unión de estos fármacos al receptor D2. Proponemos la autoestimulación de la CPF como un modelo conductual para evaluar el grado de atipicidad de los antipsicóticos de nueva generación.

P 244

EFFECTO DEL BLOQUEO CONJUNTO DE LOS RECEPTORES 5-HT₃ Y GABA_A EN LA LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA CORTICAL EN RATAS CON UNA HIPOFUNCIÓN COLINÉRGICA

Gil-Bea FJ, Domínguez J, García-Alloza M, Marcos B, Lasheras B, Ramírez MJ

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto del bloqueo conjunto de los receptores 5-HT₃ y GABA_A, con ondansetrón y flumazenilo respectivamente, sobre la liberación de acetilcolina (AC) en la corteza frontal de ratas con una hipofunción colinérgica. La lesión colinérgica se realizó por inyección de la toxina selectiva 192 IgG-saporina en el núcleo basal de Meynert, origen de la innervación colinérgica cortical. 7 y 30 días después de la lesión los marcadores colinérgicos (acetilcolinesterasa y transportador de alta afinidad para colina) mostraron una reducción significativa en corteza. Tanto a los 7 como a los 30 días después de la lesión, la administración sistémica conjunta de ondansetrón, 0,1 mg/kg, y flumazenilo, 10 mg/kg, fue capaz de aumentar significativamente la liberación de AC *in vivo*, alcanzando niveles similares a los conseguidos tras un estímulo despolarizante con K⁺ 100 mM (aproximadamente +75% de los valores basales). El tratamiento combinado también aumentó el flujo de AC cortical *in vitro* a los 30 días de la lesión, sugiriendo la posible participación de mecanismos locales intracorticales en el efecto liberador. La lesión colinérgica no influyó en la expresión de los receptores 5-HT₃ y GABA_A corticales. Los resultados del presente trabajo sugieren la potencialidad terapéutica del tratamiento combinado de ondansetrón con flumazenilo en desordenes cognitivos asociados a una hipofunción colinérgica, tales como la enfermedad de Alzheimer.

P 245

MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN *IN VIVO* DE SEROTONINA EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE RATÓN POR RECEPTORES 5-HT_{2A}. ACCIÓN DE FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS

Adell A, Bortolozzi A, Amargós-Bosch M, Díaz-Mataix L, Pons S, Artigas F

Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS). Barcelona

La corteza prefrontal medial (CPFm) de ratón contiene un gran número de receptores 5-HT_{2A}. La perfusión del agonista 5-HT_{2A}/2C DOI (100 µM) en la CPFm duplicó la liberación de serotonina (5-HT). Este efecto se revirtió mediante la coperfusión de tetrodotoxina, M100907 (antagonista 5-HT_{2A}), prazosin (antagonista α₁-adrenérgico), BAY x 3702 (agonista 5-HT_{1A}), NBQX (antagonista AMPA/KA) y 1S,3S-ACPD (agonista mGluR II/III), pero no por SB-242084 (antagonista 5-HT_{2C}) ni por MK-801 (antagonista NMDA). Asimismo, AMPA también incrementó la liberación de 5-HT en la CPFm y dicho efecto también se revirtió por BAY x 3702. La perfusión de antipsicóticos clásicos, como clorpromacina y haloperidol, y atípicos, como clozapina y olanzapina revirtió completamente el aumento de la liberación de 5-HT producido por DOI. Estos resultados sugieren que DOI aumenta la liberación de 5-HT en la CPFm de ratón a través de la estimulación de receptores 5-HT_{2A} mediante un mecanismo dependiente de impulso nervioso y que requiere, a su vez, la activación de receptores AMPA corticales. Este efecto se revierte por ligandos de receptores presentes en la propia

CPFm, posiblemente en las neuronas piramidales, que están implicados en el mecanismo de acción de fármacos antipsicóticos. En particular, el antagonismo producido por antipsicóticos clásicos puede ser debido al bloqueo de los receptores α₁-adrenérgicos, mientras que el debido a los atípicos puede deberse, además, al bloqueo de los receptores 5-HT_{2A}.

P 246

AUTOESTIMULACIÓN DE LA CORTEZA PREFRONTAL: EFECTOS DIFERENCIALES DE ANTIPSICÓTICOS Y PSICOTICOMIMÉTICOS

Chaatouf EH, Montes R, Ferrer JMR

Instituto de Neurociencias y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

Se ha descrito que los antagonistas no competitivos NMDA (MK-801, fenciclidina) inducen cuadros psicóticos en humanos. Por su parte, los antipsicóticos típicos inhiben las conductas operantes. El presente estudio investiga los efectos de la administración sistémica de haloperidol y clozapina, prototipo de la acción antipsicótica típica y atípica, respectivamente y de MK-801, un psicoticomimético, sobre la conducta de autoestimulación de la corteza prefrontal (CPF) de la rata. La elección de este modelo radica en que la CPF es una estructura de acción preferente de los antipsicóticos y está implicada en la fisiopatología de la esquizofrenia.

Los resultados han mostrado que los antipsicóticos inhiben y el MK-801 facilita la autoestimulación de la CPF y la actividad motora espontánea. La administración de haloperidol (0,1 mg/kg) y de clozapina (10 mg/kg) antagonizó los efectos facilitadores del MK-801 (0,1 mg/kg) en ambas conductas.

El hallazgo de que haloperidol y clozapina producen efectos opuestos al MK-801, refuerza la importancia de los estudios conductuales de fármacos antipsicóticos y psicoticomiméticos. Por otro lado, la capacidad del haloperidol y la clozapina para antagonizar los efectos del MK-801 sugiere que la autoestimulación de la CPF representa un modelo experimental válido en el estudio de la eficacia antipsicótica de estas drogas, en especial las de nueva generación.

P 247

VULNERABILIDAD A LAS ESTEREOTIPIAS EN RATAS ROMANAS-RHA: ESTUDIOS CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS

Cañete A, Guitart M, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Giménez-Llort L

Unidad de Psicología Médica, Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal, Instituto de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona

Las ratas romanas RHA/Verh y RLA/Verh son dos cepas seleccionadas psicogenéticamente por su rápido (RHA/Verh) o pobre (RLA/Verh) aprendizaje de la evitación activa en dos sentidos. La cepa RHA muestra mayor preferencia por la novedad y mayor conducta impulsiva-estereotipada. Estudios sobre la funcionalidad dopaminérgica diferencial entre ambas cepas sugieren que las ratas RHA podrían ser un buen modelo animal de ciertos síntomas de las psicosis humanas. El presente estudio pretende confirmar si las ratas RHA muestran diferencias, respecto a ratas RLA y Sprague-Dawley, en conductas dependientes del sistema dopaminérgico (p. ej. hiperactividad, estereotipias) inducidas por agonistas del mismo. Se determinaron las curvas de dosis-respuesta para las conductas estereotipadas tras la administración aguda de apomorfina (APO, agonista directo, 0,067-3 mg/kg, SC) y anfetamina (ANF, agonista indirecto, 0,5-2 mg/kg, SC). La respuesta a tales agonistas muestra diferencias globalmente indicativas de que las ratas RHA responden más intensamente que las otras dos cepas. Así, 1) la actividad motora espontánea es mayor en la cepa RHA; 2) las estereotipias

inducidas por APO muestran que las ratas RHA son más sensibles que las otras dos cepas; 3) las conductas estereotípicas inducidas por ANF (2 mg/kg) son más perdurables en la cepa RHA.

Financiado por Fundació Marató-TV3. Agradecemos la ayuda de M. Pérez y M. Rodríguez. M. Guitart es receptor de una beca predoctoral de la DGR.

P 248

MODULACIÓN DE AGREGADOS DE FAS EN LA ADICCIÓN A MORFINA Y TRAS DEGLICOSILACIÓN DEL RECEPTOR

García-Fuster MJ, Miralles A, García-Sevilla JA

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

El receptor proapoptótico Fas es una proteína de membrana cuya activación da lugar a la formación de agregados. La adicción a opiáceos se ha asociado con incrementos en la densidad de Fas en cerebro de rata (forma nativa de 35 kDa y glicosiladas de 48 y 51 kDa). El propósito de este trabajo fue estudiar la modulación de agregados de Fas en cerebros de ratas dependientes de morfina y averiguar si la dimerización de Fas se relaciona con el estado de glicosilación del receptor. En homogenizados totales de corteza cerebral, los agregados de Fas (~203 kDa, ~120 kDa) se detectaron mediante *Western-blot* con un anticuerpo específico (anti-Fas M-20) y se bloquearon con el péptido antigénico correspondiente. El tratamiento crónico con morfina (10-100 mg/kg, 5 días) no modificó la densidad de los agregados de Fas, pero la abstinencia espontánea (48 h) redujo la densidad del complejo de 203 kDa Fas ($14 \pm 3\%$, $n=5$, $p<0,05$). La deglicosilación de Fas (N-glicosidasa F, 15 unidades, 3 h a 37 °C) incrementó marcadamente la expresión de los agregados de 120/203 kDa (300-600%, $p<0,0001$). Los resultados indican que, contrariamente a lo observado para el Fas nativo y glicosilado, la retirada de morfina (48 h) tras un tratamiento crónico (estado de dependencia) reduce la densidad de los agregados de Fas de 203 kDa, y que la densidad de los agregados está regulada por el grado de glicosilación del receptor.

Financiado por MCT (BFI2000-0306). MJG-F es becaria predoctoral del CSIC/Unidades Asociadas.

P 249

ALTERACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE TRAS LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE ETANOL

Serrano A^a, Ferrer B^a, Del Arco I^a, Piomelli D^c, Navarro M^b, Rodríguez de Fonseca F^a

^aFundación Hospital Carlos Haya, Unidad de Investigación. Málaga.

^bDepartamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid. ^cDepartamento de Farmacología. Universidad de California. Irvine, USA.

El sistema cannabinoide endógeno está constituido por dos tipos de receptores, uno distribuido principalmente en el SNC, CB1 y otro periférico, el CB2. Sobre estos receptores actúan un conjunto de ligandos endógenos como neurotransmisores retrógrados, entre ellos el más estudiado es la anandamida. Se ha demostrado que el sistema cannabinoide endógeno participa en las acciones neurofarmacológicas de muchas drogas, como el etanol. Estudios recientes demuestran el papel de este sistema en la administración crónica de etanol y sin embargo, no hay estudios que hayan investigado las acciones agudas de este agente psicótropo. Considerando que es la principal droga de abuso en el mundo occidental junto con la nicotina hemos estudiado, los efectos de la administración aguda de alcohol (4 g/kg) en la rata Wistar sobre los niveles plasmáticos y cerebrales de anandamida, así como sobre la actividad de las enzimas de síntesis del precursor (N-aciltransferasa) y degradación (amidohidrolasa) de este

endocannabinoide. La administración aguda de etanol produjo disminuciones significativas de anandamida en cerebelo, núcleo accumbens e hipocampo, así como en plasma. Estas acciones se observaron a los 45 y 90 minutos postinyección, coincidiendo con los máximos niveles de etanol en sangre. La disminución de anandamida no afectó ni a la actividad *in vivo* ni a la *in vitro* de la N-aciltransferasa ni de la amidohidrolasa, sugiriendo que el etanol actúa sobre la fosfolipasa-D específica cuya actividad se estimula por despolarización o activación de receptores de glutámico o dopamina. Dado que el etanol es un potente inhibidor de la transmisión glutamatérgica, proponemos que la inhibición aguda de la liberación de anandamida inducida por el alcohol puede venir mediada por este mecanismo.

P 250

EFFECTO AGUDO DE LOS CANNABINOIDES SOBRE LA SÍNTESIS DE SEROTONINA EN EL CEREBRO DE RATA *IN VIVO*

Moranta D, Esteban S, García-Sevilla JA

Laboratorio de Neurofarmacología, Unidad Asociada al Instituto Cajal/CSIC, Universidad de las Islas Baleares. Palma de Mallorca

Algunos efectos de los cannabinoides están mediados por la interacción con otros sistemas de neurotransmisores, tal podría ser el caso de la serotonina (5-HT) en los procesos de aprendizaje y memoria (Egashira, et al. Eur J Pharmacol 2002; 445: 221). El propósito del estudio fue analizar el efecto agudo del principal constituyente psicoactivo del cannabis, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), y del agonista selectivo del receptor cannabinoide, WIN55212-2 (WIN), sobre la síntesis de 5-HT en el cerebro de rata *in vivo*. Para ello, se utilizó la acumulación del 5-hidroxitriptófano (5-HTP) tras inhibición de la descarboxilación con NSD 1015 (100 mg/kg, IP). Los niveles de 5-HTP, 5-HT y su metabolito 5-HIAA fueron cuantificados mediante HPLC con detección electroquímica. Tanto el THC (5-20 mg/kg, IP) como el WIN (2-4 mg/kg, IP) disminuyeron la acumulación de 5-HTP significativamente (ANOVA, $p<0,05$) en hipocampo (26-31%; 29%), corteza parietooccipital (17-20%; 24%), cerebelo (38-49%; 19%) y en una sección cerebral a nivel del *locus coeruleus* (38-43%; 29%), respectivamente. En la corteza frontal solo el WIN redujo la acumulación de 5-HTP (16%). No se observaron cambios en el contenido total de 5-HT ni en los niveles de 5-HIAA en ninguna región. Los resultados muestran un efecto inhibitorio de los cannabinoides sobre la síntesis de 5-HT y sugieren la mediación del receptor cannabinoide cerebral (CB1) en este efecto.

Financiado por MCYT (BFI2000-0306). D.M. es becario FPI (MCYT).

P 251

VARIACIONES EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 2A (5HT2A), RECEPTOR DE DOPAMINA 3 (RD3), Y REELINA EN ÁREAS NEOCORTICALES DE RATAS TRATADAS CON OLANZAPINA

Rodríguez MA^a, Padín JF^b, Dopeso-Reyes IG^a, Buceta M^b, Domínguez E^b, Loza M^a. I^b, Caruncho HJ^a

^aDpto. Biología Celular e Ecología. ^bDpto. de Farmacología, Universidad de Santiago de Compostela.

La esquizofrenia es una neuropatología en la que se han descrito alteraciones citoarquitectónicas y neuroquímicas. Los fármacos antipsicóticos actúan sobre receptores acoplados a proteínas G. Con el fin de evaluar los cambios neurohistoquímicos consecuencia del tratamiento con antipsicóticos hemos analizado mediante inmunohistoquímica la expresión del receptor 5HT2A, RD3, y reelina en la corteza frontoparietal motora y frontoparietal somatosensorial de ratas control y tratadas con dosis equipotentes de olanzapina (24 y 48 h y 16 días). En las ratas control, el receptor 5HT2A se localiza en somas y dendritas de neuronas piramidales de la capa V; tras 24 y 48 h de

tratamiento el mayor grado de inmunoreactividad se observa en dendritas de las capas I, II y III; y tras 16 días se concentra principalmente en somas infragranulares. Estudios de unión con radioligando han mostrado que las ratas tratadas sufren una disminución en la densidad de 5HT2A. Escasos somas y procesos RD3 inmunorreactivos se localizan en las capas IV, V y VI de las ratas control; el tratamiento principalmente induce un aumento de fibras inmunorreactivas en la capa IV. Tanto en las ratas control como en las tratadas, la reelina se encuentra principalmente en neuronas gabérgicas en todas las capas corticales y una banda de inmunoreactividad difusa se localiza en el neuropilo de la capa I, la cual incrementa su inmunoreactividad en las ratas tratadas. Estos resultados indican que el tratamiento con olanzapina induce cambios cuantitativos y cualitativos no sólo en sus receptores diana como 5HT2A, RD3 sino que también aumenta los niveles de reelina, una proteína implicada en migración y plasticidad neuronal, cuya expresión disminuye en esquizofrenia.

Financiación: XUGA, DGESIC y Fundació Marató-TV3.

P 252

MODULACIÓN DE LA VIA ERK/MAP-CINASAS POR MORFINA EN ESTRIADO DE RATA

Miralles A, Asensio VJ, García-Sevilla JA

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

Estudios *in vitro* sugieren que la vía de las MAP-cinasas participa en los mecanismos de transducción de señal de los receptores opioides. El propósito de este trabajo fue estudiar la modulación de las proteínas MEK1/2, ERK1/2 y sus formas fosforiladas (activadas) p-MEK1/2 y p-ERK1/2, en el estriado de ratas dependientes de morfina. En homogenados totales de estriado, la inmunoreactividad de las proteínas se determinó mediante *Western-blot* con anticuerpos específicos. Las densidades se expresan como porcentaje de control. La morfina aguda (100 mg/kg, IP, 2 h) únicamente incrementó la densidad de p-MEK1/2 ($166 \pm 13\%$, $p < 0,01$). El tratamiento crónico con morfina (10-100 mg/kg, IP, 5 días) y la abstinencia espontánea (24 h) no modificaron la densidad de las cinasas. Sin embargo, en ratas dependientes de morfina, la abstinencia inducida por naloxona (2 mg/kg, IP, 2 h) y la sustitución de la última dosis de morfina por naloxona incrementaron la densidad de p-MEK1/2 ($183 \pm 15\%$, $p < 0,05$; 233 ± 29 , $p < 0,001$) y de p-ERK2 ($137 \pm 12\%$, $p < 0,05$; 149 ± 14 , $p < 0,01$). Los resultados indican que los tratamientos agudo y crónico con morfina aparentemente no modula de modo efectivo las cinasas, pero la abstinencia inducida por naloxona (estado de dependencia) puede relacionarse con la activación de la vía de las MAP-cinasas, preferentemente dirigida a la activación de ERK2.

Financiado por MCT (BF12000-0306). V.J.A. es becario FPU del MEC.

P 253

FUSIÓN DEL FRAGMENTO C DE LA TOXINA TETÁNICA Y FACTORES NEUROTROFICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Ciriza J, Miana-Mena J, Martín-Burriel I, Muñoz MJ, Moreno M, Zaragoza P, Osta R

Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos, Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, Facultad de Veterinaria, Zaragoza

El factor neurotrófico derivado de la célula glial (GDNF) ha demostrado su eficacia mediante terapia génica en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en modelos murinos. Resultados similares han sido encontrados para el factor neurotrófico BDNF. Queda por encontrar una vía segura que permita introducir estos factores en las células nerviosas afectadas por la ELA de forma específica (motoneuronas) y prolongar los efectos de este tratamiento de forma continuada.

Nuestro grupo de investigación está estudiando el fragmento C de la toxina tetánica (TTC) como transportador de proteínas terapéuticas al sistema nervioso central (SNC). Se ha realizado la fusión genética del mismo a los fragmentos neurotróficos (GDNF y BDNF) como estudio previo a su aplicación en terapia génica de ELA y de otras posibles enfermedades neurodegenerativas de las neuronas motoras.

Se han obtenido las proteínas quiméricas en vectores de expresión procariota para comprobar la funcionalidad de las dos proteínas fusionadas (factor neurotrófico-TTC). El vector de expresión procariota utilizado ha sido pGex 4T-2, un vector de fusión a glutatión-S- transferasa que facilita la purificación de las proteínas recombinantes. Para los estudios de funcionalidad de las mismas se han utilizado líneas celulares y estudios *in vivo* observando la respuesta que producían en estos sistemas.

P 254

FRAGMENTO C DE LA TOXINA TETÁNICA EN MODELOS ANIMALES DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (SOD G93A)

Miana-Mena J, Ciriza J, Muñoz MJ, Moreno M, Zaragoza P, Osta R, Méndez M

Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos, Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, Facultad de Veterinaria, Zaragoza

Nuestro grupo de investigación está interesado en la utilización del fragmento C de la toxina tetánica (TTC) como vector de terapia génica en enfermedades neurodegenerativas de las motoneuronas.

En una fase previa hemos demostrado que la molécula de fusión B-galactosidasa-TTC alcanza centros nerviosos superiores, manteniendo la actividad enzimática que va fusionada a él. Este hecho permite pensar en la utilización del TTC como vehículo de sustancias terapéuticas hasta el sistema nervioso central (SNC). También hemos observado que el tropismo por la placa motora y el transporte retroaxonal de dicha molécula eran dependientes de la actividad neuronal, característica importante para su utilización en un posible tratamiento.

El ratón transgénico G93A/SOD-1 es un modelo para la esclerosis lateral amiotrófica humana. Los síntomas clínicos se hacen visibles a partir de los 90 días y a los 120-150 días existe una parálisis generalizada que termina con la vida del animal por insuficiencia respiratoria.

En el presente trabajo hemos realizado la inyección de la molécula híbrida B-galactosidasa-TTC en el músculo gastrocnemio de este modelo animal, en distintos estadios de la enfermedad para conocer hasta que momento la molécula es captada por las motoneuronas. Hemos observado que en estadios terminales de la enfermedad, cuando ya no existe actividad nerviosa, el tropismo del TTC por la placa motora llega a desaparecer por completo así como el transporte hasta el SNC.

P 255

DIFERENTE REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ADENILILCICLASA POR EL RECEPTOR 5-HT1A PRESINÁPTICO EN RATA Y HUMANO

Valdizán EM, Castro ME, Pazos A

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

Los receptores 5-HT1A pre y postsinápticos modifican la adenililciclase (AC) y canales de K⁺ a través de proteínas Go/i. La activación de los receptores 5-HT1A postsinápticos disminuye los niveles de AMPc en rata y humano. El mecanismo de transducción a nivel presináptico puede ser diferente en ambas especies. Hemos valorado la respuesta de la AC a la activación de los receptores 5-HT1A pre y postsinápticos con (±)8-OH-DPAT en muestras procedentes de cerebro humano y de rata. La actividad basal fue similar en todas las regiones de cerebro humano

estudiadas (100 pM AMPc/min/mg proteína); por el contrario, en la rata, la actividad basal fue mayor en el NDR (318 pM AMPc/min/mg proteína), respecto a la corteza o el hipocampo (162 y 239 pM AMPc/min/mg). El incremento de AMPc en respuesta a la forskolina fue similar en hipocampo y corteza, pero menor en el NDR en ambas especies.

Postsinápticamente, la activación de los receptores 5-HT_{1A} disminuyó la acumulación de AMPc inducida por forskolina (100%) en la corteza (Emax: 81% en la rata y 79% en el humano) y en el hipocampo (Emax: 72% en la rata y 62% en el humano). A nivel del NDR, sólo en cerebro humano se observó una inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina en respuesta a la activación de los receptores 5-HT_{1A} (85%). En la rata, se encontró un incremento del AMPc en el NDR (Emax: 127%).

Financiación: BFI2001/0592, SAF980064, F. Valdecilla y Faes-Farma SA.

P 256

ESTUDIO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA Y CRÓNICA DE MDMA EN EL RATÓN: SIGNOS ANFETAMÍNICOS AGUDOS FRENTE A SIGNOS PSICÓTICOS CRÓNICOS

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

El MDMA puede producir psicosis en humanos. El estudio se realizó para comprobar los posibles efectos psicóticos de la administración aguda (10 mg/kg IP) y crónica (1 dosis/día durante 14 días) de MDMA en el ratón, mediante una serie de paradigmas que permiten corroborar si los síntomas son de carácter psicótico. Los tests fueron: 1) de signos motores positivos (locomoción espontánea; estereotipias inducidas por apomorfina), y 2) de signos negativos (interacción social y PPI). Se emplearon dos grupos de ratones: MDMA y salino. En el tratamiento crónico, se les realizó la batería de tests los últimos cuatro días de tratamiento, y para confirmar la naturaleza psicótica se cotrató con clozapina. En el tratamiento agudo, los tests se llevaron a cabo entre 30 min y 2 h tras la inyección. Para confirmar los posibles efectos anfetamínicos del MDMA agudo, se repitió el mismo protocolo con ratones tratados con anfetamina. El tratamiento crónico con MDMA incrementó la locomoción, los movimientos rápidos, y los movimientos estereotipados inducidos por apomorfina tales como cabeceo y movimientos repetitivos de autoaseo. Sin embargo no hubo signos negativos afectados. La hiperactividad locomotora, pero no las estereotipias, fueron atenuadas específicamente por clozapina. Los resultados sugieren que la administración crónica de MDMA induce síntomas motores de perfil psicótico positivo, pero la interacción social y el filtrado sensorial (reflejado en el PPI) no se afectan. Los resultados del tratamiento agudo indican que el MDMA induce hiperactividad motora que es equiparable a la inducida por anfetamina, lo que sugiere un efecto anfetamínico del MDMA agudo. Financiado a EFE por Fundació La Marató de TV3, Ministerio de Ciencia y Tecnología, y Plan Andaluz de Investigación.

P 257

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF MEMANTINE AND GALANTAMINE IN RAT HIPPOCAMPAL SLICES SUBJECTED TO OXYGEN AND GLUCOSE DEPRIVATION

Sobrado M^a, García AG^a, López MG^a, Roda JM^b

^aDepartamento de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid.

^bUnidad Cerebrovascular, Hospital Universitario La Paz. Madrid

We have investigated the effects of a combination of memantine, a non-competitive antagonist for glutamate NMDA receptors and galantamine, an allosteric modulator for neuronal nicotinic receptors for acetylcholine, on the neuronal injury induced by oxygen and glucose deprivation (OGD) in rat hippocampal slices.

Adult Sprague-Dawley rats hippocampal slices were incubated in OGD medium for 20 min followed by a simulated «reperfusion» period. The

extent of CA1 hippocampal neuronal loss was determined by measuring the fluorescence of the viability indicator propidium iodide after each treatment. We studied the effects of two doses of memantine (10, 30 mM) and galantamine (0.3, 1 mM), alone and in the combination. At 30 mM, memantine reduced by 29% cell death in CA1 ($p < 0.05$, $n = 7$). At 1 mM, galantamine reduced by 39% cell death ($p < 0.05$, $n = 5$). The combination of 30 mM memantine plus 1 mM galantamine did not reduce cell death. However, 10 mM memantine produced a higher reduction of neuronal death, 48% ($p < 0.05$, $n = 3$); the combination of 10 mM memantine plus 0.3 mM galantamine produced a similar reduction (45%) of neuronal death ($p < 0.05$, $n = 3$).

In conclusion, galantamine and memantine decreased neuronal injury produced by OGD in CA1 hippocampal slices in adult rats. At the concentrations used, no additive neuroprotective effect was observed when both drugs were applied together. Further drug combinations, at concentrations that do not produce neuroprotection when given separately, might provide insight into our hypothesis that combination of two neuroprotectant drugs showing distinct mechanisms of action should have an additive neuroprotectant effect.

P 258

ALBUMIN PROTECTS AGAINST APOPTOSIS OF NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELLS ELICITED BY DOTARIZINE AND FLUNARIZINE, BUT NOT AGAINST THAT ELICITED BY THAPSIGARGIN

Gallego-Sandín S, Novalbos J, Rosado A, Gálvez-Múgica MA, Abad-Santos F, García AG

Instituto Teófilo Hernando, Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa. Madrid

We have compared in this study the ability of four compounds known to release Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum (dotarizine, flunarizine, thapsigargin and cyclopiazonic acid), to elicit apoptosis of SH-SY5Y cells, incubated for 24 h in a DMEM containing 10% foetal bovine serum (FBS+). After 24 incubation in FBS+ medium, cells undergoing apoptosis were around 5%. Dotarizine (30-50 μ M) enhanced apoptosis to 20%, flunarizine (30-50 μ M) to 14-18%, thapsigargin (1-10 μ M) to 20-32%, and cyclopiazonic acid (100 μ M) to only 10%. Incubation of the cells for 24 h in a DMEM deprived of serum (FBS-) enhanced basal apoptosis to 18%. In FBS- medium dotarizine and flunarizine, at 30 μ M each, drastically enhanced apoptosis to 51% and 68%, respectively; the increase was milder with 1 μ M thapsigargin (37%) and with 30 μ M cyclopiazonic acid (27%). Hence, the net increase of apoptosis after subtraction of the basal apoptosis seen in FBS-, was 5.7-, 6.2-, 1.8-, and 4-fold, respectively for dotarizine, flunarizine, thapsigargin and cyclopiazonic acid. Bovine serum albumin (BSA), at 4.9 and 2.9%, fully prevented the apoptotic effects of dotarizine, flunarizine and cyclopiazonic acid in FBS-; this was not the case for thapsigargin. Other proteins prevented too this apoptotic effect of dotarizine.

The results suggest that although having in common the ability to release Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum, the mechanism and the extent of apoptosis drastically differed between the four compounds tested.

P 259

LA ESTIMULACIÓN POSNATAL REDUCE LA RESPUESTA CONVULSIVA Y LA MORTALIDAD INDUCIDAS POR NMDA EN LAS CEPAS RHA/VERH-I Y RLA/VERH-I

Giménez-Llort L, Cañete A, Fernández-Teruel A, Tobeña A

Unitat de Psicologia Mèdica, Departament de Psiquiatria i Medicina Legal, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona

La estimulación posnatal (EP) produce profundos y perdurables efectos conductuales (p. ej., en actividad espontánea, exploración, respuestas

endocrinas al estrés, aprendizaje y memoria) y neurobiológicos (p. ej., 5HT, GABA_A, DA, ACh, eje HPA, LTP, expresión NGFIA y PKC). Destacan además sus efectos de inducción de plasticidad sináptica en hipocampo y su acción protectora frente a déficits cognitivos asociados a la edad. En estos efectos la neurotransmisión glutamatérgica puede jugar un papel relevante tal como señala, por ejemplo, el hecho que la EP atenúe la cascada neurotóxica «glucocorticoides-glutamato-calcio» (Sapolsky, 1992).

El estudio que presentamos se ha realizado en dos cepas de ratas RHA/Verh-I y RLA/Verh-I seleccionadas psicogenéticamente por su rápido (RHA) o pobre (RLA) aprendizaje de la evitación activa en dos sentidos y que difieren en su respuesta a estresores ambientales y manipulaciones farmacológicas así como en el grado de emotividad (RLA más emotiva que RHA). Los resultados aportan nuevas evidencias conductuales sobre el papel neuroprotector de la EP sobre el sistema glutamatérgico, demostrando que reduce las respuestas convulsivas inducidas por diversas dosis únicas de NMDA y la mortalidad asociada llegando en algunos casos a alcanzar incluso un grado de protección del 100% (convulsión y mortalidad inducida por NMDA 60 mg/kg, IP, en RHA/Verh-I).

Financiación: Programa Ramón y Cajal, Fundació Marató-TV3 y ayuda técnica de P. Queralt.

Membranas excitables y segundos mensajeros

P 260

PAPEL MODULADOR Y SINCRONIZADOR DE LA CORRIENTE LENTA DE POTASIO ACTIVADA POR CALCIO (sIAHP) SOBRE LA ACTIVIDAD EPILEPTIFORME EN NEURONAS PIRAMIDALES DE LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO DE RATA

Garduño J, Buño W

Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid

Hemos estudiado *in vitro* el posible papel sincronizador y modulador de la sIAHP sobre la actividad epiléptica generada por 4-AP y registrada en *whole cell* en fijación de corriente y de voltaje. La perfusión de 4-AP produjo la generación espontánea de trenes de actividad seguidos de una corriente saliente cuya amplitud y curso temporal fueron similares a los de la sIAHP generada mediante pulsos de voltaje. Esta corriente correspondió a la sIAHP sin contribución de receptores a GABA_A o GABA_B, ya que no se modificó ni su amplitud ni su curso temporal con PTX, bicuculina o saclofén. Sin embargo fue completamente suprimida cuando se registró con cesio intracelular o con trans-ACPD extracelular, lo que sugiere que los trenes epiléptiformes son seguidos de la activación de la sIAHP. Los iGluRs participan en la generación de la actividad epiléptica, pues la perfusión de AP5 y CNQX impidió la generación y propagación de la epilepsia, mientras que los mGluRs I/II no participan ya que E4CPG no bloqueó ni previno la actividad epiléptica. Durante la activación de la sIAHP se registró menor frecuencia en la actividad epiléptica, al suprimir dicha corriente, la epilepsia se generó asincrónicamente. Nuestros resultados sugieren que la sIAHP juega un papel crucial en la sincronización de la actividad anormal de CA3 ya que reduce temporalmente la excitabilidad después de la generación de cada tren de actividad.

Financiado por: DGICYT/MEC/España (PM98-0113) para W.B. y (SB2000-0050) para J.G.

P 261

MODULACIÓN DE LA DEPRESIÓN A CORTO PLAZO POR MECANISMOS NO SINÁPTICOS

Muñoz-Cuevas J, Vara H, Colino A

Departamento de Fisiología, Universidad Complutense de Madrid

La depresión sináptica es una forma de plasticidad a corto plazo que consiste en una disminución de la eficacia de la transmisión sináptica ante la estimulación repetitiva a frecuencias altas. Entre los mecanismos encargados de modular estos fenómenos, se han postulado tanto mecanismos dependientes de liberación (por ejemplo, la depleción de vesículas), como independientes de liberación (por ejemplo, la inactivación de receptores, la activación de autorreceptores, etc). En este trabajo, hemos estudiado el papel de la modulación de los potenciales de acción sobre esta plasticidad en el área CA1 del hipocampo de rata. Para ello administramos trenes de 600 impulsos a 10 Hz, observando que, además de disminuir la amplitud de la respuesta de postsináptica evocada, también se deprimía significativamente la amplitud de la respuesta de la población de potenciales de acción presinápticos. Para comprobar si este efecto sobre los potenciales de acción era calciodependiente, realizamos los mismos experimentos retirando el calcio del medio y añadiendo el quelante de calcio EGTA (2 mM), hallando que la depresión no sólo no era bloqueada, sino que era mayor y más rápida. Con el fin de entender a qué era debida esta depresión, realizamos registros intracelulares de neuronas del área CA3, encontrando que la disminución de la amplitud de la población de potenciales de acción era producida por un aumento en el número de fallos en la inducción de los potenciales de acción.

P 262

CORRIENTES IÓNICAS RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD OSCILATORIA EN NEURONAS DE LOS NÚCLEOS DE LAS COLUMNAS DORSALES EN CULTIVO

Reboreda A, Sánchez E, Romero M, Lamas JA

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

Las células de los núcleos de las columnas dorsales en cultivo presentan actividad oscilatoria rítmica en forma de ráfagas de potenciales de acción, separadas por tramos de oscilación subumbral (LTO). En el presente trabajo hemos estudiado dos corrientes que participan en la generación de esta actividad rítmica mediante la técnica de *patch* perforado.

Los datos muestran que la LTO se origina por un juego entre dos corrientes: una corriente de Na⁺ persistente, de inactivación lenta (contante de tiempo: 570 ms), que se activa a -60 mV, con un voltaje de activación medio a -50 mV y un máximo de activación a -30 mV. Se bloquea completamente con TTX y presenta cierta selectividad al bloqueo por riluzole respecto a la corriente transitoria. La corriente opuesta es una corriente persistente de K⁺ (*M-like*) de activación lenta a partir de -60 mV, que se bloquea por TEA 15 mM (75%), linopirdine 10 mM (60%), Ba²⁺ 1 mM (50%) y no es afectada de manera significativa por 4-AP y Cd²⁺. Estos dos últimos bloqueantes sí tienen un efecto claro sobre las ráfagas, desorganizándolas.

El Cd²⁺ 100 mM bloquea completamente una corriente de Ca²⁺ que se abre a -40 mV, tiene un voltaje de activación medio -20 mV y un máximo de activación a -5 mV.

Mientras que la LTO se explica por la participación de la corriente de Na⁺ persistente y la de K⁺ sensible a TEA, las corrientes que intervienen en la actividad en ráfagas requieren un estudio más detallado.

Proyecto financiado por la DGESIC (PB98-1087).

P 263

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y MOLECULAR DE LAS CORRIENTES DE POTASIO DEL CUERPO CAROTÍDEO DE RATÓN

Colinas O, Alonso A, López-López JR, Pérez-García MT
Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Universidad de Valladolid y CSIC

El cuerpo carotídeo (CC) es un quimiorreceptor arterial sensible a cambios en la concentración de gases en sangre. La participación de canales de potasio en los procesos de detección y transducción del estímulo hipóxico está claramente establecida, aunque existen amplias variaciones interespecies en la naturaleza de estos canales. Utilizando una cepa de ratones transgénicos que expresan GFP bajo el control del promotor de tirosina hidroxilasa hemos puesto a punto un cultivo de células de CC para estudiar los distintos tipos de canales de potasio presentes y su participación en la respuesta hipóxica. Tras comprobar la coexpresión de TH en las células marcadas con GFP, se han caracterizado electrofisiológicamente las corrientes de estas células. Las células de CC de ratón presentan corrientes de potasio que se activan en torno a -20 mV e inactivan lentamente. La hipoxia inhibe de forma reversible la amplitud de la corriente a $+40$ mV en un $17,07 \pm 1,3\%$ ($n=18$). El bloqueo de las corrientes por tetraetilamonio (TEA) muestra la existencia de dos subpoblaciones de canales de potasio, con IC₅₀ para TEA de $17,8 \pm 2,8$ μ M y $940,0 \pm 14,7$ μ M, respectivamente. Estas dos subpoblaciones de canales de potasio se han identificado con técnicas inmunocitoquímicas como miembros de las familias Kv2 y Kv3. El amplio conocimiento disponible del genoma del ratón facilitará la identificación en esta preparación de las bases moleculares de la quimiotransducción hipóxica.

P 264

LA DESAFERENTACIÓN ALTERA LA FUNCIÓN DEL COTRANSPORTADOR NEURONAL DE K⁺/Cl⁻ (KCC2) Y DISMINUYE LA NEUROTRANSMISIÓN SINÁPTICA INHIBIDORA

Vale C^a, Sanes DH^b
^aFacultad de Medicina y Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete, España. ^bCenter for Neural Science, New York University. New York, USA

La pérdida de la función sensorial provoca atrofia o muerte en el sistema nervioso central en desarrollo, sin embargo hay escasez de información acerca de la fisiología de las sinapsis que se mantienen. En este trabajo, hemos obtenido registros de parches perforados con gramicidina en rodajas de colículo inferior del gerbo en animales control y animales que han sido sometidos a cocleotomía bilateral. Los potenciales postsinápticos inhibidores, obtenidos por estimulación eléctrica de las terminaciones del lemnisco lateral, poseen una menor capacidad para bloquear los potenciales de acción en animales cocleotomizados. Este cambio se debe, en parte, a la alteración de la función del cotransportador neuronal de K⁺/Cl⁻ (KCC2) sin cambios apreciables en la expresión de esta proteína. Los tratamientos que inhiben el cotransporte de cloruro (bumetanida, cesio, genisteína) tienen poco efecto en neuronas de animales cocleotomizados, mientras que éstos tratamientos despolarizan el potencial de equilibrio de las corrientes postsinápticas inhibidoras en neuronas de animales control. Mediante PCR e inmunocitoquímica no se observaron cambios en la expresión del RNAm ni de la proteína después de la cocleotomía. En este trabajo concluimos que la desafrentación completa produce una rápida alteración en la función de KCC2, alterando la homeostasis de cloruro y esto disminuye la eficacia de la neurotransmisión inhibidora.

Financiado por NIH: DC00540.

P 265

LA LESIÓN UNILATERAL DEL RECEPTOR AUDITIVO DISMINUYE LA INHIBICIÓN EN NEURONAS AUDITIVAS CENTRALES: MECANISMOS DIFERENTES EN EL LADO IPSILATERAL O CONTRALATERAL A LA LESIÓN

Vale C^a, Caminos E^a, Martínez-Galán JR^a, Sanes DH^b, Juiz JM^a
^aFacultad de Medicina y Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete, España. ^bCenter for Neural Science, New York University. New York, USA

En este trabajo hemos estudiado el efecto de la cocleotomía unilateral en las propiedades sinápticas inhibitoras de neuronas del colículo inferior (CI), tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral al oído lesionado. Las corrientes postsinápticas inhibitoras, obtenidas por estimulación eléctrica del lemnisco lateral (LL), se registraron en rodajas de CI mediante registros de célula entera y de parches perforados con gramicidina, en presencia de antagonistas de neurotransmisores excitadores. La cocleotomía unilateral despolarizó el potencial de equilibrio de las corrientes postsinápticas inhibitoras 28 mV en el CI contralateral y 12 mV en el CI ipsilateral. Además, se produjo una disminución significativa de la conductancia de las corrientes postsinápticas inhibitoras tanto en el CI ipsilateral como en el contralateral. En animales cocleotomizados la liberación presináptica de neurotransmisor inhibidor, estudiada mediante el análisis de la facilitación provocada con pulsos pareados, disminuyó principalmente en el CI ipsilateral. Nuestros resultados indican que la cocleotomía unilateral disminuye la neurotransmisión inhibidora en el CI. Ésta disminución está mediada principalmente por mecanismos postsinápticos (alteración de la homeostasis de cloruro y disminución de la conductancia) en el CI contralateral a la lesión. Sin embargo, en el CI ipsilateral se observa también una alteración en los mecanismos presinápticos de liberación de neurotransmisor.

Financiado por CICYT-SAF00-0211 y Consejería de Sanidad, JCCM (JM Juiz) y NIH: DC00540 (DH Sanes).

P 266

FUNCIÓN Y ORIGEN DE LAS SINAPSIS CON Zn²⁺ VESICULAR EN LA REGIÓN CA1 DEL HIPOCAMPO

Sindreu CB^a, Jensen MS^b, Pérez-Clausell J^a
^aDepartament de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona.
^bDepartment of Neurobiology, Institute of Anatomy, Univ. of Aarhus, Denmark

Una de las características neuroquímicas más notables del hipocampo es su elevada densidad de terminales sinápticos con Zn²⁺ vesicular. Dicho Zn²⁺ podría ser coliberado durante la transmisión sináptica y modular los receptores postsinápticos. Hasta la fecha, no se ha descrito ninguna función fisiológica del Zn²⁺ en el *stratum radiatum* de CA1 y se desconoce qué neuronas dan origen a dichas proyecciones ricas en Zn²⁺. Primero, se investigó la posible función del Zn²⁺ sináptico en la potenciación a largo plazo (LTP) de rebanadas de hipocampo. Se detectó un déficit de Zn²⁺ sináptico en rebanadas de CA1 en comparación con el contenido *in vivo*. La preincubación de las rebanadas en un medio enriquecido en Zn²⁺ revirtió dicho déficit y al mismo tiempo redujo en un 50% la magnitud de la LTP en las sinapsis glutamatérgicas de CA1. La acción del Zn²⁺ sobre la LTP fue neutralizada con la presencia de un quelante de Zn²⁺ extracelular (CaEDTA, 2 mM) durante los trenes de estimulación. Segundo, se estudió el origen de los botones con Zn²⁺ en la CA1 mediante el transporte retrógrado del Zn²⁺ vesicular precipitado tras la inyección *in situ* de selenito sódico. La mayoría (80%) de las proyecciones ricas en Zn²⁺ al *stratum radiatum* de CA1 proceden de neuronas piramidales de CA3. El número de neuronas marcadas en CA3 en los hipocampos ipsi y contralateral resulta parecido. El 20% restante de neuronas marcadas corresponde exclusivamente a neuronas piramidales de CA1 ipsilateral, la mayoría de las cuales forman los contactos recurrentes en el *stratum oriens*.

En conclusión, las sinapsis con Zn^{2+} vesicular en la región CA1 proceden de una subpoblación de neuronas piramidales de CA3 y CA1, y podrían estar sujetas a la modulación de la LTP mediante la liberación sináptica del Zn^{2+} .

P 267

INMUNORREACTIVIDAD PARA EL COTRANSPORTADOR DE K-Cl⁻ (KCC2) DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA AUDITIVO DE LA RATA

Vale C, Martínez-Galán JR, Caminos E, Juíz JM

Facultad de Medicina y Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, C/Almansa s/n, 02071, Albacete

En este trabajo se ha estudiado la expresión de la proteína KCC2 en diferentes núcleos del sistema auditivo de la rata y en diferentes estadios del desarrollo posnatal. La neurotransmisión inhibitoria mediada por receptores GABA_A y receptores de glicina sensibles a estricnina depende de la activación de una conductancia para el ión Cl⁻. En neuronas, la concentración intracelular de Cl⁻ está regulada principalmente por dos proteínas: un cotransportador de Na-K-2Cl (NKCC1) que provoca la acumulación intracelular de Cl⁻ y un cotransportador de K-Cl (KCC2) que expulsa Cl⁻. Durante el desarrollo embrionario temprano la concentración intracelular de Cl⁻ es elevada debido a la actividad de NKCC1. A medida que avanza el desarrollo, la expresión de KCC2 aumenta, lo cual contribuye a mantener la concentración de Cl⁻ por debajo de su equilibrio electroquímico. El aumento en la expresión neuronal de KCC2 coincide con la transición entre sinapsis inhibitorias despolarizantes y sinapsis inhibitorias hiperpolarizantes. Mediante experimentos de inmunocitoquímica hemos observado que KCC2 muestra una expresión intensa en los núcleos cocleares ventral y dorsal, en el núcleo medial del cuerpo trapezoidal, oliva lateral superior, núcleos del lemnisco lateral y colículo inferior. Observamos expresión de KCC2 ya en el día posnatal 3 en todos los núcleos estudiados, aunque en algunos de ellos la transmisión inhibitoria es aún despolarizante en estas edades.

Financiado por CICYT-SAF00-0211 y Consejería de Sanidad, JCCM.

P 268

OSCILACIONES ESPONTÁNEAS DE CALCIO EN ASTROCITOS *IN SITU*

Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Pozas E, Senserich J, Soriano E, Aguado F

Neurobiología del Desarrollo y la Regeneración, Departamento de Biología Celular, Parc Científic de Barcelona, Universitat de Barcelona

Una de las propiedades que presentan los circuitos nerviosos durante el desarrollo es la generación de actividad espontánea coordinada neuronal. Dicha actividad es necesaria para la diferenciación y maduración de redes neuronales, principalmente a través de cambios en la concentración de [Ca²⁺].

El objetivo del presente trabajo es analizar cambios espontáneos de calcio intracelular en astrocitos *in situ*. Para ello hemos usado un ratón transgénico que expresa la proteína fluorescente GFP bajo control del promotor astrocitario GFAP. Los resultados obtenidos han mostrado que:

- 1) La presencia de oscilaciones espontáneas de calcio intracelular es una característica de las células astrogiales *in situ*.
- 2) Esta actividad se pierde durante procesos de gliosis reactiva.
- 3) Las oscilaciones espontáneas en astrocitos depende de la movilización de calcio extracelular e intracelular.
- 4) Un análisis espacio-temporal de la actividad glial revela la existencia de redes neurogliales coordinadas.
- 5) La correlación de las oscilaciones calcio intracelular en astrocitos es regulada por la actividad neuronal.

Estos resultados suponen un papel funcional de la actividad astrocitaria en el desarrollo neuronal y plasticidad sináptica.

P 269

BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA TRANSDUCCIÓN DE ESTÍMULOS TÉRMICOS EN MAMÍFEROS

De la Peña E, Mäkiä A, Belmonte C, Viana F

Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC. Alicante

Las sensaciones de frío se originan a partir de la activación selectiva de una subpoblación de neuronas sensoriales por descensos en la temperatura. Estas neuronas expresan una paleta singular de canales iónicos que incluye a TRPM8, un canal TRP activado por frío y mentol. Para investigar el papel de TRPM8 en la transducción de frío, realizamos medidas de calcio intracelular y registros electrofisiológicos en neuronas sensoriales del ganglio trigémino (GT) y en células HEK293 transfectadas con TRPM8.

En células HEK-TRPM8 mantenidas a 33 °C, descensos de temperatura causaron aumentos en el calcio intracelular con un umbral de unos 25 °C. La aplicación de mentol (100 μM) produjo una sensibilización notable del umbral (11 °C más positivo al 50% de amplitud). En estas células el frío activó una corriente catiónica no selectiva con marcada rectificación hacia fuera. El componente de salida presentó un umbral de temperatura más elevado que el de entrada, y nunca se manifestó por encima de los 25 °C.

Las neuronas cultivadas del GT mostraron un amplio espectro de umbrales (32-15 °C) en su respuesta a los cambios de temperatura. Estas respuestas también se sensibilizaron con la aplicación de mentol.

Estos resultados sugieren que el contexto celular tiene una influencia notable sobre el umbral de temperatura. En neuronas trigeminales, la gran sensibilidad a la temperatura puede deberse a mecanismos complementarios a la expresión de TRPM8.

Financiado por BF12002-03788 y SAF2001-1641.

P 270

LOCALIZACIÓN CELULAR DEL ARNm DE LA FOSFODIESTERASA PDE7B EN DISTINTAS REGIONES DEL CEREBRO DE RATA

Reyes-Irisarri E, Pérez-Torres S, Mengod G

Departamento de Neuroquímica, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS. Barcelona

La degradación del AMPc se lleva a cabo por acción de las fosfodiesterasas (PDE), clasificadas en 12 familias en función de su secuencia de aminoácidos, especificidad de sustrato, cofactores e inhibición selectiva por diferentes fármacos.

La familia PDE7, específica para AMPc, está formada por dos genes: PDE7A y PDE7B. Por estudios de hibridación *in situ* con oligonucleótidos, hemos analizado la distribución regional y celular del ARNm de PDE7B en cerebro de rata. Los niveles más altos de hibridación se observaron en tubérculo olfativo, en células granulares del giro dentado, y en la parte magnocelular del núcleo rojo. También se detectó hibridación en otras regiones como el estriado, núcleos talámicos, núcleo arcuado del hipotálamo y núcleo interpeduncular. Mediante hibridación *in situ* doble hemos determinado el tipo de células que expresan la PDE7B. Ésta se encuentra ampliamente distribuida en neuronas (identificadas con MAP2), en células gliales (marcadas con GFAP y con MBP) de algunas regiones y en algunos núcleos colinérgicos (identificados con ChAT) como la habénula medial y el núcleo oculomotor aunque no se observó este patrón de expresión en otros núcleos colinérgicos como el estriado y el tubérculo olfativo. Con estos resultados hemos identificado regiones cerebrales de interés funcional para el estudio de nuevos inhibidores específicos de la PDE7B.

Proyecto financiado por Fundación La Marató de TV3 (1017/97) y CICYT (SAF1999-0123 y 2FD97-0395).

P 271

VÍAS DE TRANSDUCCIÓN IMPLICADAS EN LA MODULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE HISTAMINA POR RECEPTORES H3 EN MINIPRISMAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA

Moreno D, Torrent A, Gómez-Ramírez J, Blanco I, Ortiz J

Unidad de Bioquímica de Medicina, Instituto de Neurociencias, Universidad Autónoma de Barcelona

Recientemente hemos descrito (Mol Pharmacol; 61: 239) que la vía de la adenilato ciclasa/PKA participa en la regulación de la síntesis de histamina por autorreceptores H3. Sin embargo, algunos efectos mediados por estos receptores no se explican por esta vía. Por ejemplo, los agonistas H3 inhiben los efectos de la despolarización sobre la síntesis de histamina independientemente de la PKA, dado que el bloqueo de la PKA no modifica la estimulación por despolarización de la síntesis ni desplaza la curva de inhibición de un agonista sobre dicha estimulación. Usando varios inhibidores selectivos de canales de calcio y proteínas quinasa, hemos demostrado que la despolarización estimula la síntesis mediante la entrada de calcio extracelular y consecuente estimulación de la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II (CaMKII). Por tanto la síntesis de histamina puede ser estimulada por dos vías de transducción, mediadas por las proteínas quinasa CaMKII y PKA. Por otra parte, se ha descrito que los receptores H3 tienen una importante actividad constitutiva que es suprimida por agonistas inversos (Nature; 408: 860). En nuestro sistema, los agonistas inversos estimulan la síntesis de histamina, lo cual se puede impedir por completo inhibiendo la PKA, pero no inhibiendo la CaMKII. Por lo tanto, es la vía de transducción de la PKA la que media los mecanismos de estimulación de la síntesis de histamina por agonistas inversos de receptores H3.

P 272

LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A 2,5-HEXANODIONA ALTERA LA FUNCIÓN DE LA VÍA GLUTAMATO-ÓXIDO NÍTRICO-GMP CÍCLICO EN NEURONAS DE CEREBELO EN CULTIVO Y EN CEREBRO DE RATA *IN VIVO*

Hernández-Viadel ML, Montoliu C, Monfort P, Erceg S, Llansola M, Rodrigo R, Sánchez-Pérez A, Felipe V

Laboratorio de Neurobiología, Instituto de Investigaciones Citológicas, FVIB. Valencia

El hexano se utiliza como solvente en procesos industriales. Es metabolizado a 2,5-hexanodiona (HD), que es neurotóxica. Sus mecanismos de neurotoxicidad no se conocen. Hemos estudiado si la exposición crónica a HD afecta la vía glutamato-óxido nítrico-GMPc en cultivos de neuronas de cerebelo o en cerebelo de ratas *in vivo*. La activación de receptores NMDA conduce a un aumento de calcio intracelular, que se une a la calmodulina y activa la óxido nítrico sintasa, aumentando el óxido nítrico (NO), que activa la guanilato ciclasa soluble (GCs), aumentando el GMPc. Parte de este GMPc se libera al fluido extracelular, permitiendo analizar, por microdiálisis cerebral, la función de la vía Glu-NO-GMPc en cerebelo *in vivo*. Esta vía participa en importantes procesos cerebrales como algunas formas de aprendizaje y memoria.

La exposición crónica de neuronas en cultivo a HD reduce un 50% la formación de GMPc inducida por la activación del receptor NMDA. La activación de GCs por NO disminuyó en un 46%.

En el cerebelo de ratas expuestas crónicamente a HD la formación de GMPc *in vivo* inducida por NMDA se redujo en un 55%. La activación de GCs por NO se redujo en un 65%.

La exposición crónica a HD afecta la vía Glu-NO-GMPc tanto en neuronas en cultivo como en el cerebelo del animal *in vivo*, indicando que las neuronas en cultivo son un buen modelo para estudiar los mecanismos de neurotoxicidad de la HD. La alteración de esta vía puede contribuir a los efectos neurotóxicos de la HD.

P 273

LA NICOTINA AUMENTA LA ACTIVIDAD DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA, PERO NO SU EXPRESIÓN NEURONAL

Weruaga E, Murias AR, Briñón JG, Barbado V, Alonso JR

Dpto. Biología Celular y Patología, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca

Es posible que los procesos moleculares y celulares de la adicción a la nicotina tengan más eslabones que los conocidos, y permitan planear nuevas estrategias terapéuticas. El óxido nítrico (NO) se produce gracias a las NO sintasas (NOS), que se presentan al menos en tres isoformas: I, II y III. Las tres están presentes en el cerebro, con control de expresión, actividad catalítica, inhibición farmacológica y fuentes celulares diferentes.

Ratas de ambos sexos se trataron sistemáticamente con inyecciones peritoneales de salino o nicotina (0,4 mg/kg durante 15 días). Se procesaron animales para un estudio histológico y para determinar la producción de NO, mediante la valoración de nitratos y nitritos (metabolitos estables del NO) en extractos frescos de tejido de la corteza prefrontal, caudado putamen y núcleo *accumbens*. El tejido fijado se procesó para detectar inmunohistoquímicamente la NOS I e histoquímicamente la NADPH-diaforasa. El tratamiento con nicotina aumenta los niveles de nitratos/nitritos, de manera más intensa en el núcleo *accumbens* de las hembras; sin embargo, el número de neuronas nitrérgicas no muestra cambios significativos. Esto implica que el aumento de producción de NO estimulado por la nicotina no conlleva el reclutamiento de nuevas neuronas.

Subvencionado por el Plan Nacional sobre las Drogas, DGES (PM99-0068), Fundación Samuel Solórzano, y Junta de Castilla y León.

Bases neuronales del comportamiento

P 274

LA ACTIVIDAD NEURONAL DE LA CORTEZA PREFRONTAL SE CORRELACIONA CON LA REPRESENTACIÓN PARAMÉTRICA DE ESTÍMULOS EN LA MEMORIA DE TRABAJO

Nácher V^a, Ojeda SF^a, Cadarso C^b, Acuña C^a

^aLaboratorios de Neurociencia y Computación Neuronal, Universidad de Santiago de Compostela. ^bUnidad de Bioestadística, Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Santiago de Compostela

La descarga de células de memoria (Fuster y Alexander, 1971) de la corteza prefrontal lateral se ha relacionado con representación paramétrica (Romo et al, 1999) y categórica (Freedman et al, 2001).

Utilizamos una tarea paramétrica en la que se requiere memorizar la orientación de una línea, referencia, seguido, después de un retraso, de una comparación de la orientación recordada con la orientación de otra línea, test. Se decide si el estímulo test está orientado a un lado u otro de la referencia. Discriminación continua: la referencia varía continuamente de ensayo a ensayo, permitiendo observar respuestas que covarien con la referencia. Discriminación fija: la referencia es siempre la misma. Discriminación fija sin referencia: la referencia no se presenta (P. Vázquez, et al; 2000).

Se registró la actividad unitaria en la corteza prefrontal, por delante del *sulcus arcuatus* en *Macaca mulatta*. Los movimientos oculares se registraron mediante técnica de seguimiento ocular con bobina magnética. Neuronas (n=106) modifican su actividad durante el retraso entre los dos estímulos. En discriminación continua la tasa de descarga varía significativamente—método de regresión logística binaria (Wald=29,701; p<0,001)— en función de la orientación del estímulo de referencia. En la discriminación fija sin referencia, la tasa de descarga es significativamente mayor que en las otras dos tareas. La hipótesis más

plausible es que estas neuronas codifican en la memoria de trabajo la orientación de los estímulos de referencia. La carga de la memoria de trabajo es mayor cuando la referencia no se presenta, probablemente al ser necesario utilizar una referencia interna.

Financiación: PB99-002 MCYT a CA; BFM2002-03213 MCYT a CC. VN y SFO FPI-MCYT.

P 275

ACTIVIDAD NEURONAL DE LA CORTEZA PREFRONTAL RELACIONADA CON LA TOMA DE DECISIONES

Ojeda SF^a, Nácher V^a, Cadarso C^b, Acuña C^a

^aLaboratorios de Neurociencia y Computación Neuronal, Universidad de Santiago de Compostela. ^bUnidad de Bioestadística, Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Santiago de Compostela

La corteza prefrontal juega un papel en la toma de decisiones y selección de respuestas. Utilizamos una tarea en la que se requiere memorizar la orientación de una línea (referencia) seguido de una comparación de la orientación recordada con la orientación de una segunda línea (test). El mono tiene que decidir si el estímulo test está orientado a un lado u otro de la referencia. El resultado de la decisión lo señala pulsando uno de dos botones. En una versión de la tarea la referencia varía continuamente de ensayo a ensayo. En otras dos versiones la referencia es siempre la misma durante los ensayos, y está presente o no (P. Vázquez, et al; 2000).

Se registró la actividad unitaria extracelular en la corteza prefrontal, por delante del *sulcus arcuatus* y en la convexidad lateral del *sulcus principalis* en *Macaca mulatta*. Los movimientos oculares se registraron mediante técnica de seguimiento ocular con bobina magnética.

Sesenta y dos neuronas modifican su tasa de descarga a partir del estímulo test. La tasa de descarga es mayor y la pendiente de cambio más acusada en los ensayos dependiendo de la decisión que tomará el mono –método de regresión logística binaria (Wald= 189,199; $p < 0,001$)–. La tasa de descarga y la pendiente de cambio son mayores cuando el mono tiene que decidir la orientación de los estímulos test más próximos a la referencia (p.ej., los más difíciles) Cuando la decisión del mono es errónea, el desarrollo temporal de la tasa de descarga se modifica con respecto a la de las decisiones correctas. Este comportamiento se observa en las tres tareas. Estos cambios en la tasa de descarga pueden reflejar decisiones categóricas en base a información sensorial y planificación motora.

Financiado por PB99-002 MCYT a CA; BFM2002-03213 MCYT a CCS. VN y SFO FPI-MCYT.

P 276

IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA Y LA ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA EN EL APRENDIZAJE ESPACIAL EN PECES

Gómez Y^a, Vargas JP^b, Portavella M^a, López JC^a

^aLaboratorio de Psicobiología, Dpto. Psicología Experimental, Universidad de Sevilla. ^bDepartment of Psychology, Bowling Green State University. USA

En mamíferos, tanto los receptores glutamatérgicos del subtipo NMDA como el NO juegan un importante papel en funciones fisiológicas como la creación de redes neurales, la potenciación a largo plazo o la formación de nuevas sinapsis que subyacen a los fenómenos de aprendizaje y memoria. En relación a estos últimos, la actividad del NO y del receptor NMDA suele apreciarse en aquellas situaciones donde los sujetos aprenden complejas estrategias conductuales, como por ejemplo el aprendizaje espacial. Por el contrario, esta implicación se ha determinado escasa en procesos de aprendizaje no asociativos o de carácter asociativo simple. En peces aptinopterigios, la especialización del área lateral del palio telencefálico en el aprendizaje espacial ha mostrado una estrecha similitud funcional al hipocampo de mamíferos y aves. Sin embargo, existen pocos

datos en relación a los procesos moleculares que podrían mediar los fenómenos de aprendizaje asociativo complejo en peces. Con este objetivo, el presente estudio analizó el posible efecto amnésico del antagonista del receptor NMDA MK-801 y el inhibidor de la actividad óxido nítrico sintetasa L-NAME en el aprendizaje de lugar en *goldfish*. Los resultados mostraron que, al igual que sucede en mamíferos, el bloqueo selectivo de los receptores NMDA y del NOS disociaron claramente los procesos de aprendizaje de lugar de aquellos relacionados con la simple asociación estímulo-respuesta. La estrecha similitud funcional observada en los procesos de aprendizaje y memoria analizados sugiere la posibilidad de que, al menos, algunos de los rasgos implicados en estos fenómenos pudieran haber aparecido muy temprano en la evolución de los vertebrados, y posiblemente retenidos en grupos de muy distinto linaje.

P 277

LA ATRACCIÓN INNATA POR FEROMONAS MASCULINAS EN HEMBRAS DE RATÓN NO ESTÁ MODULADA POR ESTEROIDES SEXUALES

Moncho-Bogani J^a, Lanuza E^b, Lorente MJ^a, Agustín MC^a, Martínez-Ricós J^a, Moya M^a, Martínez-García F^a

^aDpto. de Biología Funcional y Antropología Física.

^bDpto. de Biología Celular, Universitat de València

El comportamiento sexual femenino de roedores depende de su estado hormonal. Este comportamiento comienza con una atracción innata hacia las feromonas sexuales masculinas (Moncho-Bogani, et al. *Physiol Behav* 2002; 77: 167-76), por lo que quisimos analizar si esta atracción también depende de esteroides sexuales. Para ello ovariectomizamos 32 hembras criadas en ausencia de estímulos químicos masculinos, con las que formamos 4 grupos que tratamos con aceite, progesterona, estradiol y estradiol + progesterona respectivamente. Posteriormente analizamos la atracción de estas hembras hacia feromonas masculinas en su primer encuentro con las mismas, así como su comportamiento sexual proceptivo. Los cuatro grupos mostraron una atracción por la feromona ($t=5,28$, $p < 0,001$) que era independiente del tratamiento (ANOVA: $F_{3,21}=0,47$; $p=0,7$). Por el contrario, sólo las hembras tratadas con varias dosis de estradiol o con estradiol + progesterona mostraron comportamiento sexual proceptivo. Estos datos indican que, aunque el comportamiento sexual femenino es modulado por esteroides la atracción por feromonas masculinas no lo es, al menos en hembras sin experiencia. Por tanto el sustrato neural de esta atracción no incluye neuronas sensibles esteroides. Así pues las feromonas atraen a las hembras en cualquier estado hormonal e inducen en ellas cambios neuroendocrinos que desencadenan el estro endocrino y comportamental.

Financiado por MCyT y FEDER (BFI2001-3535).

P 278

HACIA UN MODELO FENOMENOLÓGICO DEL CONTROL NEUROMUSCULAR DE LOS MOVIMIENTOS PALPEBRALES

Sánchez-Campusano R^a, Delgado-García JM^b, Gruart A^b

^aCentro de Biofísica Médica, Univ. de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

^bDivisión de Neurociencias, L.A.B., Univ. Pablo de Olavide. Sevilla, España

Se presenta un modelo matemático de la cinética palpebral a partir de una analogía biomecánica, donde el mecanismo básico de los movimientos de parpadeo se representa como un sistema global e integrado de elementos inerciales, elásticos y viscosos. Modelos de esta naturaleza permiten la predicción teórica de la actividad neuromuscular. Aquí, se ha registrado el EMG de los músculos *orbicularis oculi* (OO) y elevador del párpado superior (EPS) y el movimiento palpebral mediante la técnica del seguidor magnético de la posición. Las inferencias del modelo se obtuvieron de respuestas palpebrales reflejas y condicionadas en ratón, conejo y gato. Estas magnitudes se han modelado mediante funciones del tiempo que reproducen la posición, velocidad y

aceleración palpebral, así como un conjunto adicional de parámetros descriptivos (distensibilidad inercial, características del estímulo y las constantes de tiempo, velocidad y posición). El cálculo de estas magnitudes se justifica porque el control neuromuscular de los movimientos de parpadeo requiere de las relaciones analíticas entre las fuerzas musculares, la frecuencia de descarga de las unidades neuronales reclutadas (motoneuronas del OO en el núcleo facial y del EPS en el núcleo motor ocular común) y las variables cinemáticas. Se determinaron las relaciones causa (cinética)-efecto (cinemática) del parpadeo en los dominios del tiempo, la frecuencia y el plano de estados. Se tuvo en cuenta la extensión de la membrana nictitante como consecuencia pasiva de la retracción del globo ocular, siendo el músculo *retractor bulbi* (motoneuronas del núcleo accesorio del núcleo motor ocular externo) el efector primario en tal proceso de retracción. Realizado con ayuda de la DGICYT (BFI2002-00936).

P 279

IMPLICACIÓN DE LA POLISIALIZACIÓN HIPOCAMPAL DE NCAM EN EL ALMACENAMIENTO DE MEMORIAS TRAUMÁTICAS

Sandi C, López-Fernández MA, Cambon K, Venero C
Departamento de Psicobiología, UNED. Madrid

La adición de ácido polisialílico (PSA) a la molécula de adhesión celular neural reduce los procesos de adhesión celular y juega un papel crítico en la regulación de las interacciones celulares y en la sinaptogénesis. El entrenamiento en diversas tareas de aprendizaje se ha visto relacionado con un incremento en la expresión de PSA en el giro dentado. Sin embargo, utilizando el modelo de condicionamiento del miedo al contexto, hemos observado que si bien el entrenamiento bajo condiciones aversivas moderadas (intensidad de choque 0,4 mA) induce un incremento en la expresión de PSA, cuando las condiciones son 'altamente' aversivas (choque 1 mA), se produce una reducción en la expresión de PSA. En este estudio investigamos si la reducción de la expresión de PSA en animales tratados bajo condiciones moderadamente aversivas potenciaría el condicionamiento del miedo. Para ello, ratas Wistar fueron inyectadas icv con endoneuroaminidasa (enzima que elimina PSA) bien antes (12-24 h preentrenamiento) o inmediatamente después de haber sido entrenadas en la prueba de condicionamiento del miedo (choque 0,4 mA). Mientras las inyecciones postentrenamiento fueron inefectivas, el tratamiento preentrenamiento con EndoN incrementó la magnitud y duración del condicionamiento del miedo al contexto. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de PSA-NCAM consecuente a la vivencia de experiencias estresantes podría estar implicada en el establecimiento duradero de las memorias traumáticas.

P 280

LA SÍNTESIS DE NOVO DE PROTEÍNAS ES NECESARIA PARA LA ADQUISICIÓN DE UN CONDICIONAMIENTO CLÁSICO DEL REFLEJO CORNEAL EN RATONES

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

Durante la última década se ha generado una controversia considerable acerca de la necesidad de síntesis *de novo* de macromoléculas a lo largo del aprendizaje de una nueva tarea motora o cognitiva. Por su parte, existen datos que sugieren que la necesidad de síntesis de nuevas proteínas en el aprendizaje depende en gran medida del paradigma experimental que se utilice. En nuestro laboratorio, hemos diseñado un paradigma de condicionamiento clásico de traza del reflejo corneal en ratones, donde usamos como estímulo condicionado e incondicionado un choque eléctrico en el párpado. Utilizando este paradigma de aprendizaje, hemos evaluado el papel de la síntesis de proteínas en el aprendizaje de esta nueva tarea. Inyecciones subcutáneas

de anisomicina, un potente inhibidor de la síntesis proteica, 30 minutos antes de las sesiones de condicionamiento, bloquean completamente la adquisición del condicionamiento de traza del reflejo corneal. Dicho efecto parece específico de este tipo de aprendizaje asociativo, pues la respuesta refleja del párpado ante un choque eléctrico o la actividad motora del animal inyectado con anisomicina es indistinguible de aquellas que se dan en animales controles inyectados con salino. Además, la anisomicina no destruye los circuitos implicados en el aprendizaje de la nueva tarea ya que el mismo condicionamiento realizado 10 días después de la última inyección de anisomicina sí es adquirido. Experimentos en realización nos permitirán discernir el curso temporal de la síntesis de nuevas moléculas, así como las áreas del cerebro que están implicadas en la adquisición del condicionamiento clásico de traza del reflejo corneal. Trabajo financiado por La Caixa, JA/CVI-122, FISSS (01-0194) y DGICYT (BFI2002-00936).

P 281

PARTICIPACIÓN DE DISTINTOS GRUPOS MUSCULARES EN EL CIERRE DEL PÁRPADO DEL CONEJO

Leal-Campanario R, Barradas JA, Delgado-García JM, Gruart A
División de Neurociencias, L.A.B., Universidad Pablo de Olavide. Sevilla

El cierre del párpado en especies que poseen membrana nictitante requiere que se: a) inactive el músculo elevador; b) active el músculo *orbicularis oculi*; c) active el músculo *retractor bulbi*, y d) active el músculo de Müller. También es precisa la recuperación elástica de diversos ligamentos y aponeurosis. Aquí, se ha determinado la contribución de cada sistema muscular participante en el cierre activo del párpado, en particular cuando se trata de compensar la ausencia de uno, o más, de ellos. Se utilizaron 30 conejos, divididos en 4 grupos experimentales: a) control; b) con el nervio facial seccionado; c) con el músculo *retractor bulbi* desinsertado; y d) con el nervio facial seccionado y el músculo *retractor bulbi* desinsertado. A todos los animales se les implantó una bobina metálica en el párpado superior (para registrar su movimiento con el seguidor magnético de la posición) y electrodos bipolares para el registro del EMG del músculo *orbicularis oculi*. A la mitad de los sujetos del grupo control se les implantaron, además, electrodos bipolares para registrar el EMG del músculo *retractor bulbi*. Se registraron respuestas palpebrales reflejas y aprendidas mediante un paradigma de condicionamiento clásico. Los resultados mostraron la capacidad de cerrar el párpado de todos los sujetos experimentales así como de elaborar respuestas aprendidas, con un curso temporal similar a los sujetos control. Sin embargo, se encontraron claras diferencias en la cinética de la respuesta palpebral según el sistema motor superviviente. Se determinó la capacidad adaptativa o compensatoria de los tres sistemas motores (facial, accesorio del motor ocular externo y extraocular) implicados en la cinemática palpebral.

Financiado por DGICYT BFI2002-00936.

P 282

FENOTIPO CONDUCTUAL DE UN MODELO MURINO DE SOBREPRESIÓN DE TRKC

Sahún I^a, Martín M^b, Gratacós M^a, Maldonado R^b, Ferrer I^c, Fillat C^a, Estivill X^a, Dierssen M^a

^aPrograma Genes y Enfermedad, Centro de Regulación Genómica.

^bDepartamento de Farmacología, Universidad Pompeu Fabra.

^cUnidad de Neuropatología, Universidad de Barcelona. Barcelona

En nuestro laboratorio hemos definido la asociación de los trastornos de pánico con una duplicación genómica (DUP25) en la región 15q24-q26. Entre los genes contenidos en la región duplicada, un posible candidato para explicar el fenotipo de pánico es el gen NTRK3 que

codifica para el receptor de la neurotrofina NT3, detectado en el *locus coeruleus*. La sobreexpresión de TRKC en el LC podría producir una disregulación en la actividad noradrenérgica central. Para determinar las consecuencias funcionales de una sobreexpresión de TrkC *in vivo*, se generó un modelo de ratón transgénico de sobreexpresión TgNTRK3. Las pruebas de reactividad emocional reflejaron un patrón de respuesta anormal a lo largo de las diferentes sesiones experimentales en TgNTRK3, tanto en campo abierto como en White and Black Box (entradas compartimento iluminado $t = -2,260$; $p = 0,033$). Por último, en una batería de pruebas específica de pánico y ansiedad, el *Mouse Defense Test Battery*, se detectó en TgNTRK3 una dificultad para establecer mecanismos de defensa contextual (*crossings* ANOVA $F(2,896)$, $p = 0,026$); velocidad máxima (ANOVA $F(15,27)$, $p = 0,001$); distancia (ANOVA $F(5,585)$, $p = 0,027$). También se observó una prolongada conducta de freezing en el ratón transgénico a lo largo de las diferentes subpruebas, especialmente en el pasillo recto ($t = -4,358$; $p = 0,0001$; test *t* de Student) así como un incremento en la respuesta de escape del TgNTRK3 en el subtest de evitación, y una disminución significativa del número de orientaciones. Los resultados sugieren que la sobreexpresión de TrkC en el ratón da lugar a un fenotipo caracterizado por un respuesta diferencial en pruebas de ansiedad/pánico. Financiado por SAF2001-1231, DURSI (IS), fundación CIEN.

Otros

P 283

ALTERACIÓN EN LA ACTIVACIÓN ENDÓGENA DE CREB EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO DE RATONES CON DEGENERACIÓN RETINIANA

Álvarez-Lopez C^a, Cernuda-Cernuda R^a, Alcorta E^b, Álvarez-Viejo M^a, García-Lana B^a, García-Fernández JM^a

^a Departamento de Morfología y Biología Celular.

^b Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo

Se examinó el efecto de la pérdida de los fotorreceptores clásicos, conos y bastones, sobre la activación del factor de transcripción CREB (por fosforilación en el residuo Ser133) en el núcleo supraquiasmático (SCN). Para este propósito, secciones de cerebro de ratones C3H rd/rd y +/- fueron inmunomarcadas con un anticuerpo que reconoce la forma activada de la proteína, p-CREB.

Ambos ratones, normales y rd/rd, mantenidos en condiciones constantes de oscuridad mostraron variaciones circadianas en el marcaje nuclear de p-CREB: el número de núcleos inmunopositivos en la noche subjetiva fue mayor que el observado durante el día subjetivo. No obstante, algunas diferencias fueron detectadas entre ambos grupos: 1) el número de núcleos inmunomarcados para p-CREB en el NSQ de ratones rd/rd fue más reducido a lo largo de un ciclo de 24 horas; 2) el tiempo en el cual la activación de CREB comienza a aumentar en la noche subjetiva está retrasado con respecto a los normales.

Un estímulo de luz en la noche subjetiva aumenta el número de núcleos inmunomarcados para p-CREB en el NSQ de ratones rd/rd, mientras que no se encontraron efectos significativos cuando el estímulo de luz se suministraba en el día subjetivo. Resultados similares se obtuvieron en ratones normales.

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que el mecanismo molecular endógeno CREB/CRE está afectado de alguna manera por la pérdida de los fotorreceptores clásicos que ocurre en ratones rd/rd.

P 284

LAS NEURONAS CON CONSTANTE DE TIEMPO SINÁPTICA GRANDE DETECTAN COINCIDENCIAS. RESPUESTA NEURONAL

Moreno R, Parga N

Departamento de Física Teórica, Universidad Autónoma de Madrid

En este trabajo estudiamos las propiedades de disparo del modelo de neurona de Lapicque cuando la actividad presináptica está filtrada por sinapsis. Este modelo es equivalente a un circuito eléctrico con una resistencia y un condensador en paralelo, y ha sido el ejemplo típico estudiado en el campo de la neurociencia teórica.

A pesar de su simplicidad, ha proveído a los teóricos de una herramienta muy útil para realizar predicciones sobre el comportamiento de modelos de neuronas más realistas.

Nosotros estudiamos el modelo de Lapicque en el caso más realista en que la actividad presináptica es filtrada en primer lugar por sinapsis. Las sinapsis tienen una constante de tiempo τ_{syn} , que varía típicamente desde unos milisegundos (sinapsis AMPA y GABA_A) hasta varias decenas o incluso centenares de milisegundos (GABA_B y NMDA). El efecto de estas constantes de tiempo tan largas sobre la dinámica neuronal ha permanecido oscuro.

Tampoco es evidente si estas constantes de tiempo son grandes o pequeñas comparadas con la constante de tiempo de membrana de la neurona, τ_{m} , que podría variar entre 1 y 50 ms dependiendo de la conductancia sináptica inducida por la actividad presináptica.

En nuestro trabajo encontramos que las escalas de tiempo sináptica proveen a la neurona de un mecanismo para la «detección de coincidencias» en intervalos de tiempo τ_{syn} . En nuestro trabajo ilustramos este comportamiento con resultados analíticos que comprobamos con simulaciones.

P 285

RESONANCIA EN LA RESPUESTA DE UN MODELO DE NEURONA CON PLASTICIDAD SINÁPTICA DE CORTA DURACIÓN

De la Rocha J, Moreno R, Parga N

Departamento de Física Teórica, Universidad Autónoma de Madrid

Se analiza el efecto de la plasticidad sináptica de corta duración en la respuesta de un modelo simple de neurona. El modelo de sinapsis contiene los efectos de facilitación y depresión, producidos por la existencia de calcio residual y por el agotamiento de las vesículas, respectivamente.

Se simula la evolución del potencial de una neurona que recibe una corriente sináptica. Ésta se genera mediante la actividad sincrónica de una población de neuronas presinápticas que disparan en modo aleatorio con frecuencia f . El agotamiento de las vesículas impone que la corriente media sature cuando f crece por encima de valores entorno a $f_{\text{sat}} = 20$ Hz. Así, la corriente media no contiene información sobre f por encima de este valor.

Dado que las neuronas presinápticas disparan de forma sincrónica, la fusión de vesículas ocurre también con un cierto grado de sincronía. Esto hace que la corriente muestre grandes fluctuaciones, permitiendo que el potencial de membrana alcance el umbral de disparo. Sin embargo, cuando f está en el régimen de saturación, el grado de sincronía en la fusión de vesículas disminuye, produciendo una corriente con fluctuaciones menores. Esto implica que f_{out} disminuye a medida que f aumenta, produciendo una función de transferencia con un máximo situado a una f resonante. En consecuencia, la información sobre cambios en f , cuando $f > f_{\text{sat}}$, puede ser transmitida por la modulación de las fluctuaciones, que muestran un comportamiento resonante.

P 286**PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE UCP2 EN EL CEREBRO DE RATA Y SU RELACIÓN CON LAS CATECOLAMINAS: IMPLICACIÓN EN LA TRANSMISIÓN EN VOLUMEN**

Rivera A^a, Fuxe K^b, Valderrama JJ^a, Peñafel A^a, Gago B^a, Horvath TL^c, De la Calle A^a

^aDepartamento de Biología Celular, Universidad de Málaga.

^bDepartment of Neuroscience, Karolinska Institute. Stockholm, Sweden.

^cSection of Neurobiology. Yale University. New Haven, USA

La familia de proteínas UCP (*uncoupling proteins*) se localiza en la membrana mitocondrial interna y una de sus funciones es la de interrumpir el gradiente de protones a través de dicha membrana, disipando en forma de calor la energía destinada a la síntesis de ATP. En el sistema nervioso central UCP2 se expresa abundantemente en el hipotálamo, zona donde también se ha demostrado la existencia de una mayor temperatura y que se ha asociado con el control la comunicación interneuronal. En el presente trabajo hemos estudiado la localización de UCP2 en otras áreas del cerebro y su relación con las catecolaminas, utilizando para ello técnicas inmunocitoquímicas. En el núcleo accumbens UCP2 se localiza principalmente en el *shell*, aunque existen zonas de baja expresión que se corresponden con áreas que reciben escasa inervación dopaminérgica. También se han observado axones arrosariados en corteza, estriado, tubérculo olfatorio, islas de Calleja y cuerpo calloso que expresan la enzima tiroxina hidroxilasa (TH). Las células dopaminérgicas de sustancia negra y las células noradrenérgicas del *locus coeruleus* también contienen UCP2. El solapamiento en la distribución de catecolaminas y UCP2 sugiere que esta proteína puede desempeñar un papel relevante en la transmisión en volumen, facilitando la difusión de las catecolaminas en el espacio extrasináptico mediante la generación de gradientes térmicos y corrientes de convección locales.

Financiado por MCYT (BFI2002-00587) y JA (CTS-0161).

P 287**ENTRENAMIENTO MOTOR PREOPERATORIO Y EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE MONOS PARAPLÉJICOS**

García-Miguel MJ^{a,b}, Cavada C^a, Ramón-Cueto A^b

^aDepartamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. ^bInstituto de Biomedicina de Valencia, CSIC

En el contexto de un proyecto dirigido a estudiar en primates la regeneración axónica en lesiones medulares mediante autotrasplantes de glía envolvente olfatoria, hemos diseñado un test motor para evaluar y cuantificar la función motora voluntaria de las extremidades inferiores en monos *Macaca mulatta*. El diseño incluye una silla específica y un dispositivo que mide el ángulo de desplazamiento de cada extremidad cuando el animal flexiona la cadera. Esta medida permite calcular la fuerza y el momento del movimiento. Empleando este dispositivo, monos adultos machos fueron entrenados a flexionar la cadera en respuesta a una orden; se les consideró bien entrenados cuando realizaban al menos tres secuencias seguidas de diez órdenes consecutivos (se presentará un video).

Una vez entrenados, los monos fueron sometidos a una sección completa de su médula espinal en los segmentos T8-T9. Durante el postoperatorio estos animales parapléjicos pueden desplazarse y alimentarse de forma autónoma usando sus miembros superiores en la jaula acondicionada a su nueva situación. Diariamente, los monos reciben cuidados específicos con atención especial al vaciado vesical e intestinal, rehabilitación de miembros inferiores y prevención de trombosis venosa. Además, se les realiza una exploración neurológica para valorar su evolución. Financiado por la Junta de Castilla y León; contribuyó la ayuda de la Comunidad de Madrid 08.5/0010/2000.

P 288**INTERACCIONES FUNCIONALES ENTRE EL ÁREA DE DEFENSA HIPOTALÁMICA Y REGIONES PROTUBERANCIALES CARDIORRESPIRATORIAS**

Dawid-Milner MS, López-González MV, Díaz-Casares MA, Peinado C, Lara JP, González-Barón S

Departamento de Fisiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga

La estimulación del área de defensa hipotalámica (aDH) en ratas produce taquipnea, hipertensión y taquicardia. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar las interrelaciones morfofuncionales del aDH con regiones protuberanciales de control cardiorrespiratorio. Se valoró la expresión protuberancial de c-Fos tras estimulación eléctrica del aDH (trenes 5 s, 1 ms, 20-50 μ A, 100 Hz, cada 0,2 Hz durante 90 min). Se observó presencia significativa de c-Fos en el complejo parabraquial (cPB) y área A5 ipsilaterales. Posteriormente se estudió la variación de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación del aDH (1 ms, 20-50 μ A, 100 Hz, 5 s) antes y después de la microinyección de muscimol (0,4 nM en 100 nL) en el cPB y área A5. La microinyección de muscimol en la región medial del cPB o en el área A5 disminuye sólo la respuesta cardiovascular a la estimulación del aDH ($p < 0,01$). La aplicación de muscimol en la región lateral del cPB inhibe la respuesta respiratoria al aDH ($p < 0,001$) y disminuye la cardiovascular ($p < 0,01$). El estudio se completó con registros extracelulares de neuronas del cPB y área A5. Se observaron respuestas excitadoras en neuronas del cPB (latencia de $15,2 \pm 5,9$ ms, $n=50$) y del A5 (latencia de $15,2 \pm 7,5$ ms; $n=21$) por estimulación del aDH. Estos resultados aportan nuevos datos del papel de la protuberancia en la modulación de la actividad cardiorrespiratoria evocada por estimulación del aDH.

Subvencionado por la DGESIC PM99-0163.

P 289**RESPUESTA CARDIORRESPIRATORIA EVOCADA POR ESTIMULACIÓN DE LA SUSTANCIA GRIS PERIACUEDUCTAL: FUNCIÓN DEL ÁREA A5**

Peinado C, López-González MV, Dawid-Milner MS, Lara JP, González-Barón S

Departamento de Fisiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga

La estimulación de la región dorsolateral de la sustancia gris periacueductal en ratas (dl-PAG) produce una respuesta cardiorrespiratoria caracterizada por taquipnea, hipertensión y taquicardia. La respuesta cardiovascular es similar a la obtenida durante la estimulación del área A5 protuberancial (Dawid-Milner, et al. Pflügers Arch Eur J Physiol 2001; 441: 434-43). Para estudiar el papel del A5 en la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación de la dl-PAG se realizaron, en rata anestesiada (pentobarbital sódico, 60 mg/kg IP) y con respiración espontánea, microinyecciones de muscimol (50-100 nL, 0,2-0,4 nM) en el A5. Se estudió la variación de la respuesta cardiorrespiratoria evocada por estimulación eléctrica de la dl-PAG (pulsos de 1 ms, 10-20 μ A, 100 Hz, durante 5 s) antes y después de la inhibición de somas del A5 con muscimol.

Después de muscimol disminuye la intensidad de la respuesta respiratoria a la estimulación de la dl-PAG ($p < 0,01$) y la taquicardia, ($p < 0,01$). No se modifica la respuesta presora.

Estos resultados aportan nuevos datos del papel del área A5 en la modulación de la actividad cardiorrespiratoria evocada por la estimulación de la dl-PAG y pone de manifiesto la importancia de la protuberancia como punto de relevo en los circuitos neuronales de integración cardiorrespiratoria.

Subvencionado por la DGESIC PM99-0163.

P 290**MARCADORES NUCLEARES DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN LA CADENA MIGRATORIA ROSTRAL**

Valero J, Weruaga E, Recio JS, Arévalo R, Alonso JR
 Dpto. Biología Celular y Patología. Instituto de Neurociencias
 de Castilla y León. Universidad de Salamanca

La cadena migratoria rostral (RMS) es la región del sistema nervioso central de los mamíferos adultos con mayor proliferación y migración celular.

Hemos comparado la validez de los marcadores de proliferación celular: antígeno nuclear de proliferación celular y bromodeoxiuridina, optimizado las técnicas de procesamiento de los tejidos y desarrollado un protocolo para su doble detección inmunohistoquímica. El mejor fijador resultó ser el Bouin-4% (variante del fijador de Bouin con un 4% de paraformaldehído) y el mejor tratamiento previo a la detección inmunohistoquímica de BrdU fue la incubación de criosecciones 1 h en HCl 2N a 37 °C. Además, el tratamiento con choques térmicos en medio ácido incrementa la intensidad de la tinción. Gracias a la realización de estas pruebas, hemos podido distinguir entre tres tipos de marcaje nuclear: homogéneo, granular y homogéneo con gránulos densos. Estos distintos tipos de marcaje nos permiten diferenciar los estadios del ciclo celular de las células de la RMS, y detectar variaciones en las diversas regiones de ésta. Este protocolo permite estudiar diferencias en la proliferación y migración en distintas situaciones experimentales que afecten a la RMS.

Subvencionado por DGES (PM99-0068), Junta de Castilla y León, Fundación Samuel Solórzano y Plan Nacional sobre las Drogas.

P 291**EFFECTO DE LA EXPERIENCIA VISUAL SOBRE LA VASCULARIZACIÓN DEL CÓRTEX VISUAL DE LA RATA**

Bengoetxea H^a, Argandoña EG^b, Bulnes S^a, Lafuente JV^a

^a Departamento de Neurociencias, ^b Departamento de Enfermería I,
 Euskal Herriko Unibertsitatea/Universidad del País Vasco. Leioa

La experiencia modula el desarrollo posnatal de los sistemas sensoriales, especialmente durante el llamado período crítico que en el córtex visual de la rata se sitúa entre la 3.^a y la 5.^a semana. Los cambios inducidos por la experiencia influyen en la demanda energética. Nuestro objetivo es cuantificar los efectos de la privación y estimulación de experiencia visual sobre la vascularización cortical.

En el presente trabajo, se ha cuantificado la densidad vascular a lo largo del desarrollo posnatal (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 semanas) comparando ratas criadas en condiciones estándares (K), ratas criadas en oscuridad (O) y ratas criadas en un entorno visual complejo (EC). Para la cuantificación de la red vascular se ha utilizado la histoquímica de la lectina LEA en secciones de parafina. Las ratas han sido criadas conforme a la Directiva de la UE (86/609/ECC).

Los resultados demuestran que la diferencia de densidad vascular empieza a ser significativa a partir de la 4.^a semana en las ratas EC y a partir de la 5.^a en las ratas O. En ambos casos las diferencias son máximas en la 9.^a semana, siendo un 11,7% menor en el caso de las ratas O respecto a las K y de un 24,5% mayor en el caso de las ratas EC respecto a las K, lo que nos indica que el nivel de estímulos visuales guarda una relación directa con el desarrollo de la vascularización de la corteza visual.

P 292**EXCITOTOXICIDAD EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS GRANULARES DE CEREBELO POR LIBERACIÓN DE GLUTAMATO ENDÓGENO**

Babot Z, Suñol C

Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones
 Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS). Barcelona

Ciertas patologías del sistema nervioso central se han relacionado con alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica, produciéndose una acumulación de glutamato en el espacio extracelular que resulta tóxica para las neuronas. Sin embargo, no está bien establecida cuál es concentración tóxica efectiva de glutamato extracelular.

En el presente trabajo, la aplicación de un estímulo despolarizante (100 mM de KCl) en cultivos primarios de células granulares de cerebelo produjo una liberación de glutamato endógeno en el medio de exposición, alcanzándose concentraciones de 2-3 μ M, las cuales se relacionan con una disminución de la viabilidad del 40 %. Ambos efectos –liberación de glutamato y muerte neuronal– fueron inhibidos por antagonistas del receptor NMDA (MK801 y AP5), indicando muerte por excitotoxicidad. De la misma manera ambos efectos fueron revertidos por antagonistas del receptor GABA_A (bicuculina y picrotoxina), por el plaguicida organoclorado α -endosulfán y por el bloqueante de canales de cloruro ácido niflumico. Otros agentes bloqueantes de canales de cloruro no tuvieron efecto, así como tampoco lo tuvo la bumetanida (inhibidor del NKCC).

En conclusión, además de la implicación de los receptores NMDA, el mecanismo de excitotoxicidad en células granulares de cerebelo presenta dependencia de canales de cloruro operados por GABA y de canales de cloruro dependientes de calcio.

Financiado por FIS 01/1318. Z. Babot es becaria predoctoral FPU del MEC.

P 293**COLOCALIZACIÓN DE MESOTOCINA Y OPSINA EN EL HIPOTÁLAMO DE XENOPUS LAEVIS**

Álvarez-Viejo M^a, Cernuda-Cernuda R^a, Álvarez-López C^a,
 García-Lana B^a, DeGrip WJ^b, García-Fernández JM^a

^a Departamento de Morfología y Biología Celular, Universidad de Oviedo.

^b Department of Biochemistry, Universidad de Nimega. Países Bajos

La existencia de células fotosensitivas extrarretinales y extrapineales, ha sido establecida en la mayoría de los vertebrados no mamíferos. Se ha demostrado que estas células llamadas fotorreceptores encefálicos son esenciales para la regulación de los ritmos circadianos y la detección del fotoperíodo.

Empleando un anfibio, *Xenopus laevis*, y anticuerpos contra proteínas de la fototransducción, hemos localizado células positivas en el encéfalo de esta especie. El marcaje neuronal se encuentra en el núcleo preóptico magnocelular del hipotálamo y las proyecciones axonales se dirigen hacia la neurohipófisis. En este núcleo se localizan neuronas neurosecretoras clásicas que se caracterizan por ser vasotocinérgicas o mesotocinérgicas. Analizando secciones consecutivas y realizando dobles marcajes comprobamos que las neuronas opsinopositivas coexpresan mesotocina, no habiéndose observado en ningún caso coexpresión con vasotocina. La proximidad entre las fibras LHRH y las fibras mesotocina/opsina positivas en algunas regiones de encéfalo, tales como la eminencia media, sugieren que podría existir alguna interacción entre esos dos sistemas. Proponemos que las neuronas mesotocinérgicas, que están conectadas con el sistema GnRH en otras especies, estarían directamente involucradas en la fotorrecepción encefálica de *Xenopus*. Estos hallazgos representan una notable contribución a la comprensión de cómo la luz influye en los ciclos estacionales reproductivos en vertebrados inferiores.

P 294**LA DEFICIENCIA DE HORMONA TIROIDEA PROVOCA ALTERACIONES EN LA ORGANIZACIÓN DE LA ZONA SUBVENTRICULAR EN RATAS ADULTAS**

Montero-Pedrazuela A^a, Sanz-Sancristóbal M^a, Perez-Arago M^b, Escobar del Rey F^a, Bernal J^a, García-Verdugo JM^b, Guadaño-Ferraz A^a

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid.

^b Departamento de Biología Celular, Universidad de Valencia

La zona subventricular (SVZ) y el giro dentado son las principales áreas de neurogénesis en mamíferos adultos. Se conoce con detalle su organización, incluyendo las células madre, pero apenas se saben los mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación en estas regiones.

Las hormonas tiroideas (HT) son cruciales en el desarrollo y función del sistema nervioso (SN). Su déficit en etapas críticas del desarrollo provoca graves alteraciones del SN, sin embargo es poco conocida su actividad en el adulto. El objetivo ha sido estudiar los efectos del déficit de HT sobre la organización de la SVZ en ratas adultas, bien hipotiroideas desde la gestación o tiroidectomizadas adultas.

Los estudios con microscopía electrónica (ME) y proliferación (BrdU) indican que el hipotiroidismo, tanto prenatal como adulto, altera la estructura y composición celular de la SVZ en el adulto. La SVZ es más gruesa y su citoarquitectura está desorganizada en ratas hipotiroideas y al ME se ve un alto grado de inmadurez al compararla con SVZ de ratas normales. Además, el número de neuroblastos migradores está disminuido. Esto podría deberse a alteraciones en la diferenciación de los precursores o a variaciones en la proliferación o muerte celular.

Este estudio indica la importancia del mantenimiento del nicho neurogénico de la SVZ, así como su plasticidad y las alteraciones de su estructura por déficit de HT en el adulto.

Financiación: AGF es contratada Ramón y Cajal y AMP es becaria del MCyT (BFI2001-2412).

P 295**ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN DE LA ZONA SUBVENTRICULAR EN RATONES MUTANTES NULOS PARA LOS GENES DE REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR p53 Y p27Kip1**

Gil-Perotín S^a, García-Verdugo JM^a, Zindy F^b, Roussel M^b, Soriano M^a, Casaccia-Bonnet P^c

^a Dpto. Biología Celular, Universidad de Valencia. Burjassot, Valencia, España. ^b St. Jude Children's Research Hospital. Memphis, TN, USA.

^c Dept. Neuroscience and Cell Biology, UMDNJ. Piscataway, NJ USA

Se conoce la existencia de neurogénesis en la zona subventricular (SVZ) de cerebro adulto en mamíferos. La SVZ está compuesta por cuatro

tipos celulares: neuroblastos (células A), precursores de amplificación (células C), células madre (células B) y endimocitos. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la proliferación, salida del ciclo celular y diferenciación de las células madre aún se desconocen. Estudios previos demuestran que tanto el gen supresor tumoral, p53, como el inhibidor del ciclo celular, p27Kip1 se expresan en SVZ.

Anteriormente caracterizamos la SVZ de ratones *knock-out* (KO) para el gen p27Kip1. Las células C presentaban un incremento significativo en los mutantes que, sin embargo, no se correlacionaba con el aumento de células A. Esto sugería que diferentes tipos celulares están sometidos a distintos mecanismos de regulación del ciclo celular.

En el presente estudio caracterizamos la proliferación y diferenciación en SVZ de ratones KO para el gen p53, y dobles KO p27Kip1xp53. La pérdida de la función del gen p53 conlleva un incremento de células A debido a la interferencia en la apoptosis y a un aumento moderado de la proliferación. Los dobles KO muestran un incremento mucho más llamativo en la proliferación, y distorsión en la citoarquitectura de la SVZ. Como conclusión, extraemos que la regulación del ciclo celular en la SVZ tiene lugar mediante mecanismos paralelos, no redundantes, que actúan en un contexto celular específico.

P 296**CÉLULAS MADRE RESPONSABLES DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN LAGARTOS**

González-Granero S^a, García-Verdugo JM^a, Desfilis E^b, Font E^b

^a Dpto. Biología Celular, Universidad de Valencia. Burjassot, Valencia.

^b Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia. Valencia

Los lagartos de la especie *Podarcis hispanica* presentan neurogénesis adulta en muchas áreas telencefálicas. Las nuevas neuronas se originan en el epéndimo de los ventrículos laterales desde donde migran a su destino final para diferenciarse. El objetivo de este estudio es identificar y caracterizar los tipos celulares responsables de la neurogénesis adulta en *P. hispanica* empleando cortes ultrafinos seriados para reconstruir la composición y organización tridimensional del epéndimo del ventrículo, autoradiografía con timidina tritiada para identificar las células madre, y BDA aplicada en la superficie del telencéfalo para investigar si las células madre son radiales.

Como resultado de este trabajo hemos identificado dos tipos celulares principales en el epéndimo de los ventrículos laterales: tipo I y tipo II. Las células tipo I poseen un único cilio, mientras que las de tipo II son multiciliadas. Ambos tipos celulares son radiales y poseen una ultraestructura similar. La proporción de estos tipos celulares varía en las distintas zonas del ventrículo, siendo las de tipo I más frecuentes en áreas de epitelio pseudoestratificado (que sugiere un intensa actividad proliferativa), y las de tipo II, en áreas de epitelio monoestratificado. A cortos tiempos de supervivencia tras una inyección de timidina tritiada, todas las células marcadas son tipo I. Esto sugiere que las células tipo I son las células madre responsables de la neurogénesis adulta en lagartos.