

# Estudio del fármaco CMP Forte y del nucleótido UTP encélulas de Schwann

**Tània Martiáñez Canales**

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





**I. ÍNDICE**

<b>I. ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>III. RESUMEN</b> .....	<b>13</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>VI. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>25</b>
1. EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO .....	<b>27</b>
1.1. Células que estructuran el Sistema Nervioso Periférico	
1.1.1. Células gliales del Sistema Nervioso Periférico: las células de Schwann	
1.1.1.1. El proceso de mielinización: la vaina de mielina	
1.1.1.2. Factores de transcripción implicados en mielinización	
1.1.1.3. Uniones adherentes en las células de Schwann: papel de la N cadherina	
1.1.1.4. Papel de las células de Schwann en el daño y la reparación axonal	
2. FISIOPATOLOGÍA PERIFÉRICA: NEUROPATÍAS .....	<b>40</b>
2.1. Las neuropatías periféricas	
2.1.1. Tratamientos de las neuropatías	
2.1.1.1. El fármaco Núcleo CMPForte®	
3. LOS NUCLEÓTIDOS COMO SEÑAL DE COMUNICACIÓN CELULAR .....	<b>45</b>
3.1. Los receptores purinérgicos	
3.1.1. Los receptores purinérgicos P2X	
3.1.1.1. Agonistas y antagonistas de los receptores P2X	
3.1.2. Los receptores purinérgicos P2Y	
3.1.2.1. Agonistas y antagonistas de los receptores P2Y	

3.1.2.2. Vías de señalización a través de receptores P2Y: MAPK

3.1.2.3. Receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina: importancia del UTP

3.1.2.4. Los receptores P2Y en el sistema nervioso

3.1.2.4.1. Actuación de los nucleótidos como neurotransmisores

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....59**

### **1. CULTIVOS CELULARES**

1.1. Líneas celulares

1.2. Medios y soluciones de cultivos celulares

1.2.1. Mantenimiento de la línea celular RT4D6P2T

1.2.2. Obtención del cultivo primario de células de Schwann

1.3. Densidades de siembra y tratamiento de las células

1.4. MTT

1.5. Ensayos de adhesión intercelular

1.6. Transfección celular

### **2. MÉTODOS BIOQUÍMICOS .....66**

2.1. Electroforesis y Western blot

2.1.1. Lisis celular y determinación proteica

2.1.2. Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

2.1.3. Detección de proteínas

2.2. 2DE-DIGE

2.2.1. Preparación de la muestra e isoelectroenfoque (IEF)

2.2.2.	Separación 2-DE y análisis de imagen	
2.2.3.	Espectrometría de masas e identificación de proteínas	
2.3.	Ensayos luciferasa	
2.4.	Medición de calcio intracelular	
3.	MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	<b>74</b>
3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa	
3.1.1.	Extracción de RNA	
3.1.2.	Transcripción inversa y amplificación de DNA por PCR	
3.1.3.	Amplificación de DNA por PCR en tiempo real	
3.2.	Amplificación y purificación de ADN	
3.2.1.	Obtención de células DH5a competentes, transformación y crecimiento de bacterias	
3.2.2.	Purificación de DNA plasmídico (mini preparaciones)	
4.	MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	<b>77</b>
4.1.	Técnicas inmunocitoquímicas	
4.1.1.	Inmunocitoquímica con fluorescencia	
4.1.2.	Inmunocitoquímica con Phalloidina-FITC	
5.	ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA.....	<b>78</b>
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>

***CAPÍTULO I. El UTP induce cambios proteicos y citoesqueléticos a través de la activación de receptores P2Y en células de Schwann***

1. Toxicidad del fármaco Núcleo CMP Forte® en células de Schwann RT4D6P2T
2. Expresión de los recptores P2Y en células de Schwann
3. Funcionalidad de los receptores P2Y
4. Análisis proteico mediante la técnica 2DE-DIGE
5. Validación de los cambios proteicos
6. La sobre expresión proteica y la reorganización del citoesqueleto de actina dependen de la actividad de los receptores P2Y

***CAPÍTULO II. La proteína de adhesión N cadherina está regulada por el UTP***

***extracelular en las células de Schwann .....92***

1. El UTP extracelular incrementa la adhesión y la adhesión intercelular
2. El nucleótido UTP aumenta la expresión de N cadherina de forma dosis dependiente en las células de Schwann
3. Los receptores purinérgicos regulan la sobre expresión de N cadherina por UTP
4. El UTP extracelular induce la activación de MAPK en células de Schwann
5. La señalizaión de las MAPK regula la expresión de N cadherina
6. Selectividad de los inhibidores o relación cruzada de las MAPK en presencia de UTP extracelular en las células de Schwann
7. La activación de las MAPK por parte del UTP depende de la actividad de los receptores purinérgicos
8. Importancia de los sitios de unión AP1 en la expresión de N cadherina a través de la señalización purinérgica
9. Incremento de la expresión y la fosforilación de los factores e transcripción c-fos y c-jun en presencia de UTP extracelular en células de Schwann

**IX. DISCUSIÓN .....109**

<b>X. CONCLUSIONES .....</b>	<b>123</b>
<b>XI. ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>127</b>
<b>XII. ANNEXOS.....</b>	<b>133</b>

1. ARTÍCULO 1. "*UTP affects the schwannoma cell line proteome through P2Y receptors leading to cytoskeletal reorganization*". Tània Martíàñez, Montserrat Carrascal, Aloi Lamarca, Mònica Segura, Núria Durany, Roser Masgrau, Joaquín Abian, Alejandro Gella. *Proteomics (segunda submisión enviada)*
2. MANUSCRITO en preparación. "*N cadherin is regulated by extracellular UTP in Schwann cells*". Tània Martíàñez, Aloi Lamarca, Mònica Segura, Núria Durany, Alejandro Gella, Núria Casals.
3. ARTÍCULO 2. "*Generation of digital responses in stress sensors*". Tània Martíàñez, Sílvia Francès, José Manuel López Blanco. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 23902-2391.
4. ARTÍCULO 3. "*A nucleotide-based drug protects against glutamate- and MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity*" Alejandro Gella, Tània Martíàñez, Aloi Lamarca, Cristina Gutiérrez, Núria Durany, Núria Casals. *Neuroscience and Medicine*, 2011, 2, 154-160.
5. ARTÍCULO 4. "*Modulation of Amyloid B peptide 1-42 citotoxicity and aggregation in vitro by glucose and chondroitin sulphate*". X. Fernández Busquets, J.Ponce, R.Bravo, M.Arimon, T. Martíàñez, A.Gella, J.Cladera, N.Durany. *Current Alzheimer Disease*, 2010, 7, 428-438.

<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>237</b>
---------------------------------	------------



## **II. ABREVIATURAS**



## II. ABREVIATURAS

<b>2DE:</b> electroforesis en gel bidimensional	<b>FBS:</b> suero bovino fetal
<b>aa:</b> aminoácido	<b>GFAP:</b> <i>glial fibrillary acidic protein</i>
<b>ATP:</b> adenosina 5' trifosfato	<b>GAPDH:</b> <i>glyceraldehyd 3'phosphate dehydrogenase</i>
<b>AMPc:</b> adenosina monofosfato cíclico	<b>IP3:</b> inositol trifosfato
<b>Arp3:</b> <i>actin related protein 3</i>	<b>IGF:</b> <i>insulin like growth factor</i>
<b>ANX11:</b> annexina 11	<b>IEF:</b> isoelectroenfoque
<b>ACN:</b> acetonitrilo	<b>KDa:</b> Kilodalton
<b>BPB:</b> <i>bromophenol blue</i>	<b>LB:</b> <i>Luria Broth Base</i>
<b>BDNF:</b> <i>brain derived neurotrophic factor</i>	<b>MAPK:</b> proteínas quinasas mitogénicas
<b>cdNA:</b> ácido desoxiribonucleico complementario	<b>MTT:</b> 3, (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide
<b>CaMKIIβ:</b> proteína quinasa dependiente de calmodulina β	<b>mA:</b> miliamperios
<b>CMP:</b> citidina monofosfato	<b>MAG:</b> <i>myelin associated glycoprotein</i>
<b>CMT:</b> <i>Charcot Marie Tooth Disease</i>	<b>MALDI:</b> Ionización/desorpción por láser asistida por matriz ( <i>matrix assisted laser desorption ionization</i> )
<b>CNTF:</b> <i>cilliray neurotrophic factor</i>	<b>NCAM:</b> <i>neural cell adhesion molecule</i>
<b>CAMs:</b> <i>cellular adhesion molecules</i>	<b>NGR1:</b> receptor de neuregulina 1
<b>CHAPS:</b> sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propano	<b>NGFR:</b> <i>nerve growth factor receptor</i>
<b>DEPC:</b> dietil pirocarbonato	<b>NT3:</b> neurotrofina 3
<b>DNA:</b> ácido desoxiribonucleico	<b>NGF:</b> <i>neural growth factor</i>
<b>DMSO:</b> dimetil sulfóxido	<b>NP40:</b> nonidet P-40
<b>D.O:</b> densidad óptica	<b>PBS:</b> <i>phosphate buffer saline</i>
<b>DTT:</b> ditionitrosol	<b>Pb:</b> pares de bases
<b>DRG:</b> <i>dorsal root ganglion</i>	<b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa
<b>DIGE:</b> differential in gel electrophoresis	<b>P2R:</b> receptores purinérgicos
<b>EDTA:</b> ácido etilendiaminotetraacético	
<b>EM:</b> espectrometría de masas	

**Pha-FITC:** phalloidina conjugada a FITC

**P2X:** P2R ionotrópicos

**P2Y:** P2R metabotrópicos

**PLC:** fosfolipasa C

**PMP22:** *peripheral myelin protein 22*

**P75R:** *neurotrophine receptor P75*

**PMD:** *Pelizaeus Merzbacher Disease*

**PI3K:** fosfoinositol 3 quinasa

**PDI:** *protein disulfide isomerase*

**pI:** punto isoeléctrico

**PDGF-BB:** *platelet-derived growth factor BB*

**RNA:** ácido ribonucleico

**RE:** retículo endoplasmático

**RabGDI:** *Rab dissociation inhibitor  $\beta$*

**SDS-Page:** *sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis*

**SNC:** sistema nervioso central

**SNP:** sistema nervioso periférico

**SNA:** sistema nervioso autónomo

**TBS:** *Tris buffer saline*

**TEMED:** tetrametiletilendiamida

**TCA:** ácido tricloroacético

**UTP:** uridina trifosfato

**UMP:** uridina monofosfato

**UDP:** uridina difosfato

**UV:** ultravioleta

**V:** voltios

**VCAM:** *vascular cell adhesion molecule*

**WB:** western blot

### **III. RESUMEN**



### III. RESUMEN

Las neuropatías periféricas representan una de las mayores complicaciones del Sistema Nervioso Periférico sobretodo en pacientes diabéticos. A pesar de la enorme importancia de dicha complicación, pocos son los fármacos efectivos para su tratamiento. Hasta ahora los únicos tratamientos que se suelen prescribir se basan en la inhibición del dolor del paciente.

Núcleo CMPForte® es un fármaco compuesto por nucleótidos (UMP, UDP, UTP y CMP) que se prescribe a pacientes con afecciones en el Sistema Nervoso Periférico como procesos inflamatorios y neuropatías de diversos orígenes; sin embargo, se desconoce cuál es su mecanismo de acción. Debido a que los nucleótidos extracelulares pueden actuar como moléculas de señalización, nuestro grupo se centró en el estudio de los efectos del fármaco CMPForte® y de los nucleótidos trifosfato en las células mielinizantes periféricas, una de las poblaciones más importantes en la regeneración axonal: las células de Schwann. Para ello hemos utilizado como modelo la línea inmortalizada de Schwann RT4D6P2T y cultivos primarios procedentes de ratas neonatales.

Los resultados han demostrado que la presencia de nucleótidos provoca cambios morfológicos y una reestructuración del citoesqueleto de actina que depende de la actividad de los receptores P2Y y de la presencia del nucleótido UTP. Éste provoca una sobre regulación de algunas proteínas implicadas en la nucleación de actina (Arp3), estrés del retículo endoplasmático y de la movilización del calcio intracelular (PDI), transporte vesicular (RabGDI) y traducción proteica (EF2). No sólo existen reorganizaciones de actina si no que aparecen contactos intercelulares que aumentan la adhesión. Este proceso es debido a un aumento en la expresión de N cadherina. La regulación de esta proteína por parte del UTP depende a su vez de la vía de señalización PKC-MAPK. De entre ellas, tres MAPK (JNK, P38 y ERK1/2) están implicadas en su regulación y a la vez en la expresión de dos factores de transcripción: c-fos y c-jun. El promotor de N cadherina contiene lugares de unión AP-1 sensibles a homodímeros formados por c-jun y heterodímeros formados por c-jun y c-fos y el tratamiento con UTP provoca un aumento de dichos factores de transcripción de forma dependiente de la actividad de las MAPK.

Como conclusión, podemos decir que el tratamiento con el fármaco CMP Forte® en las células de Schwann provoca una sobre expresión de proteínas y una reorganización de la actina a través de la actividad de receptores P2Y. Además, el nucleótido presente en el fármaco induce a la sobre regulación de la proteína de adhesión N cadherina favoreciéndose la adhesión intercelular. Por lo tanto, los nucleótidos extracelulares podrían beneficiar los procesos (Abbracchio et al. 1994)(Abbracchio et al. 1994)(Abbracchio et al. 1994) de migración y de adhesión en presencia de daño axonal, favoreciendo los primeros contactos intercelulares entre células de Schwann y/o axones antes de remielinizar y regenerar el daño provocado en el SNP.



## **IV. JUSTIFICACIÓN**



## IV.JUSTIFICACIÓN

Las neuropatías periféricas implican alteraciones a nivel de SNP. Hasta el momento se han descrito más de 100 neuropatías periféricas diferentes que provienen de diversas etiologías. Las causas pueden darse por lesiones del nervio, tumores, toxinas, respuestas autoinmunes, deficiencias nutricionales, desordenes vasculares y metabólicos e incluso por alcoholismo. A pesar de la elevada incidencia de esta patología en la sociedad actual (de hasta un 6 % de la población mundial) aún no existen tratamientos del todo satisfactorios. El correcto control que causa la neuropatía es la base para la correcta regeneración de los axones dañados. También han aumentado los tratamientos eléctricos que promueven la regeneración de los nervios. En cuanto tratamiento farmacológico, mayoritariamente se prescriben fármacos sintomatológicos que tratan el dolor. En este marco, el fármaco Núcleo CMP Forte<sup>®</sup>, compuesto por los nucleótidos citidina-5-monofosfato (CMP), uridina-5-trifosfato (UTP), uridina-5-difosfato (UDP) y uridina-5-monofosfato (UMP) es uno de los pocos fármacos que se prescribe para el tratamiento de patologías del Sistema Nervioso Periférico (neuritis y neuropatías de origen osteoarticular, metabólico e infeccioso); cuyo efecto se basa en la capacidad de regenerar y proteger el daño axonal. Diversos trabajos clínicos han presentado efectos fisiológicos beneficiosos de este fármaco, sin embargo, se desconocen en detalle los mecanismos moleculares y las rutas de señalización que induce en neuronas y en las células mielinizantes periféricas. El presente trabajo pretende identificar los cambios a nivel molecular y celular inducido por el fármaco Núcleo CMP Forte<sup>®</sup> en las células mielinizantes o células de Schwann con el objetivo de entender la farmacodinámica (mecanismo de acción) del fármaco y mejorar la posología de administración del fármaco así como sugerir nuevas indicaciones farmacológicas.

Este trabajo se enmarca en un Proyecto de Investigación concertado entre la empresa farmacéutica Ferrer Internacional, S.A. y la universidad Internacional de Catalunya. El proyecto ha sido financiado por Ferrer Internacional, S.A. y ha contado con el apoyo de la beca Junior Faculty de la Obra Social "La Caixa".







## V.OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo es identificar los mecanismos moleculares inducidos por el fármaco Núcleo CMP Forte® en las células mielinizantes (células de Schwann) del Sistema Nervioso Periférico.

Objetivos específicos:

- ✚ Determinar los cambios proteicos que tienen lugar en las células de Schwann tras la administración de Núcleo CMP Forte® e identificar el componente nucleotídico del fármaco responsable de dichos cambios así como los receptores purinérgicos que los median.
- ✚ Estudiar el efecto del Núcleo CMP Forte® sobre la proteína de adhesión N cadherina, así como la ruta de señalización implicada.



## **VI. INTRODUCCIÓN**



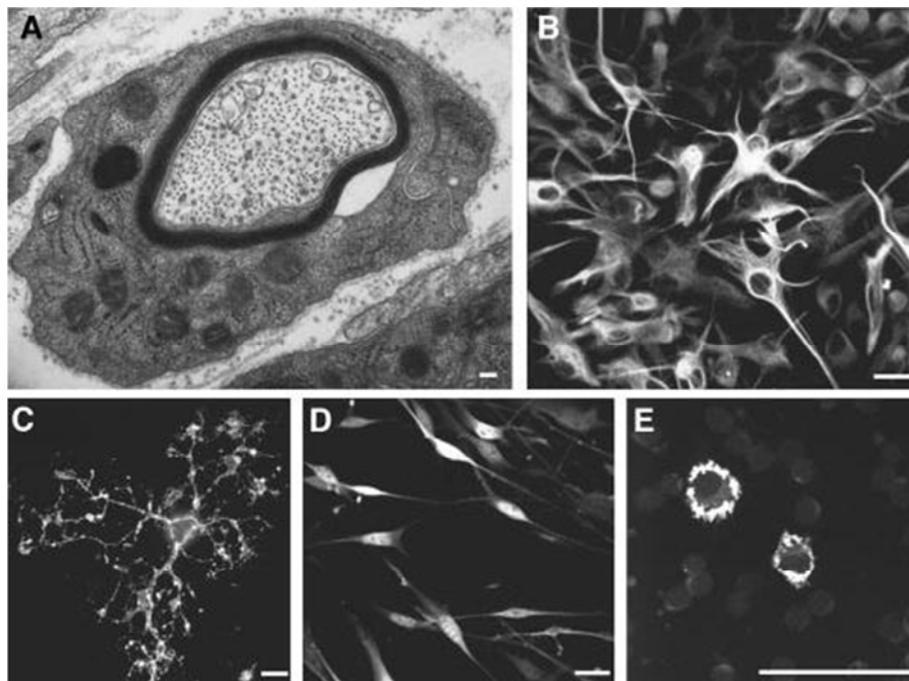
## VI.INTRODUCCIÓN

### 1. EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO

El sistema nervioso es un conjunto de tejidos especializados en el control de acciones y reacciones del cuerpo. El sistema nervioso de los vertebrados a diferencia de los invertebrados se divide en dos partes: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC lo componen el encéfalo (cerebro, cerebelo y tronco del encéfalo) y la médula espinal, englobados ambos por meninges y estructuras óseas (cráneo y columna vertebral respectivamente). El SNP, sin embargo, carece de estructuras óseas y está formado por ganglios (agrupaciones neuronales) y por nervios (craneales, espinales y autónomos).

#### 1.1. Células que estructuran el Sistema Nervioso Periférico

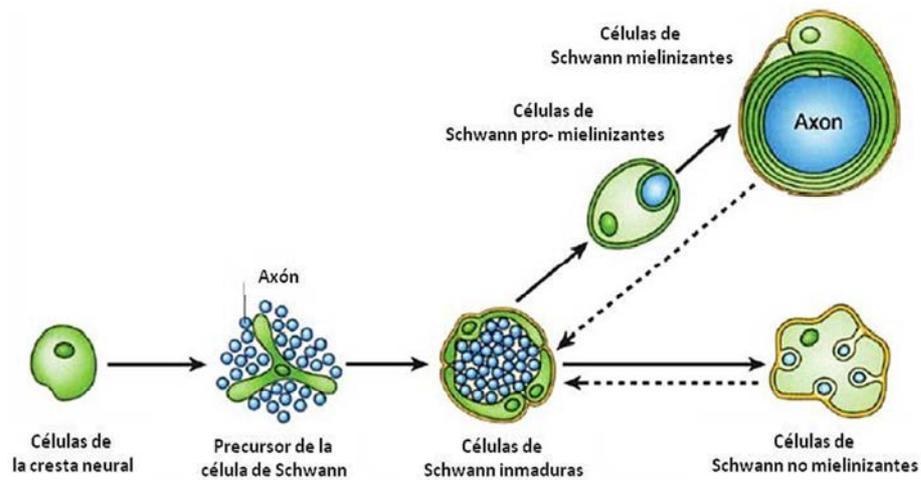
El SNP presenta dos tipos principales de células: las neuronas y las células gliales o neuroglía. Las neuronas son células excitables encargadas del procesamiento de la información y de la transmisión de ésta, mientras que la neuroglia forma el soporte mecánico, trófico, de aislamiento y de protección de las neuronas (**Figura 1**). La vaina de mielina formada por las células de Schwann y los oligodendrocitos recubre los axones y permite el correcto paso de los impulsos eléctricos. La glía del SNP consta principalmente de células capsulares, células de Müller y células de Schwann. A pesar de que sólo las neuronas se han descrito como células excitables, recientemente se ha postulado que las células gliales también pueden estar implicadas en la señalización de los impulsos nerviosos (Kimmelberg 2010, Yang et al. 2008).



**Figura 1.** Tipos más frecuentes de glía del Sistema Nervioso. En la figura A se muestra por microscopía electrónica un axón sensorial de ratón mielinizado por una célula de Schwann. En el B astrocitos del SNC creando redes con las neuronas. En el C un oligodendrocito, cada una de las proyecciones va a mielinizar 1 axón. La figura D muestra diversas células de Schwann en cultivo y finalmente en la E se muestran células de microglía del SNC (Fields et al. 2002).

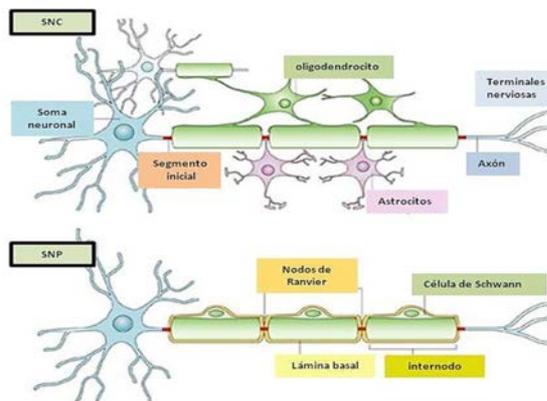
### 1.1.1. Células gliales del Sistema Nervioso Periférico: las células de Schwann

Las células de Schwann son las células gliales más importantes del SNP y tienen la función de dar soporte mecánico y metabólico a las neuronas. Proviene de células pluripotenciales de la cresta neural que bajo guía axonal proliferan y se diferencian desde células precursoras a células inmaduras; y éstas a células mielinizantes o no mielinizantes (Mirsky et al. 2001a, Jessen et al. 2005, Woodhoo et al. 2008, Gould 1990) (**Figura 2**). La evolución de células de Schwann inmaduras a células maduras (no mielinizantes o mielinizantes) depende, como comentaremos más adelante, de la expresión de diferentes factores de transcripción (Birchmeier et al. 2008).



**Figura 2.** Fases del desarrollo en las células de Schwann. Se divide en la aparición de tres poblaciones diferentes: primero las células migratorias de la cresta neural, después las células precursoras de Schwann, en tercer lugar las células inmaduras de Schwann que según guía axonal mielinizarán o no. Resaltar la reversibilidad de algunos de los procesos (flechas segmentadas). Imagen adaptada de (Jessen et al. 2005).

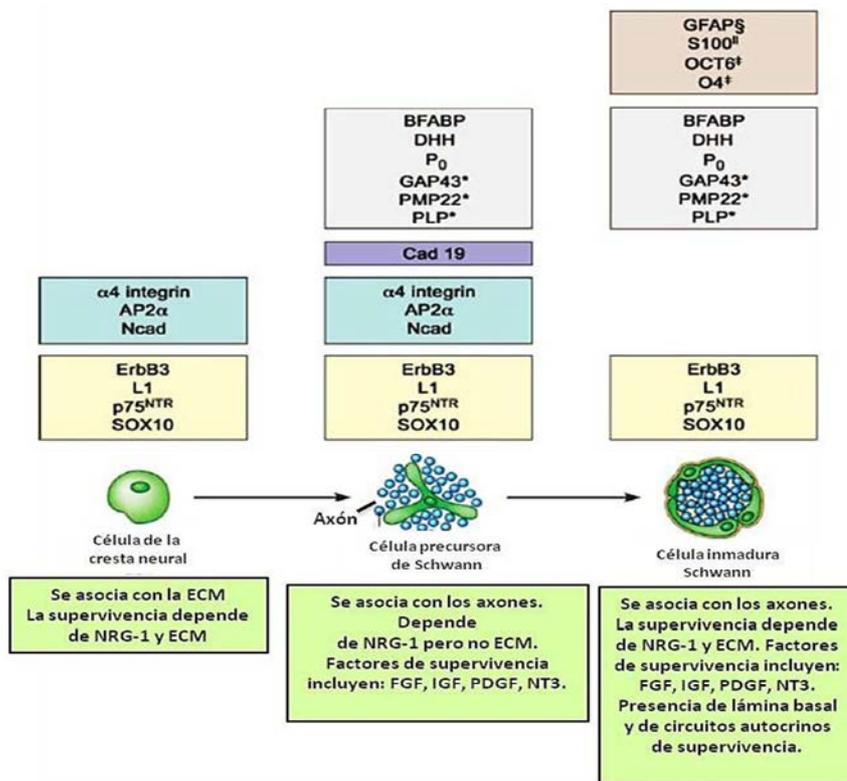
A diferencia del SNC, una célula de Schwann envuelve a un solo axón mientras que en el SNC los oligodendrocitos envuelven a más de una fibra nerviosa (**Figura 3**).



**Figura 3.** Representación esquemática de la mielinización por parte de los oligodendrocitos en el SNC y de las células de Schwann en el SNP. Adaptado de (Poliak et al. 2003).

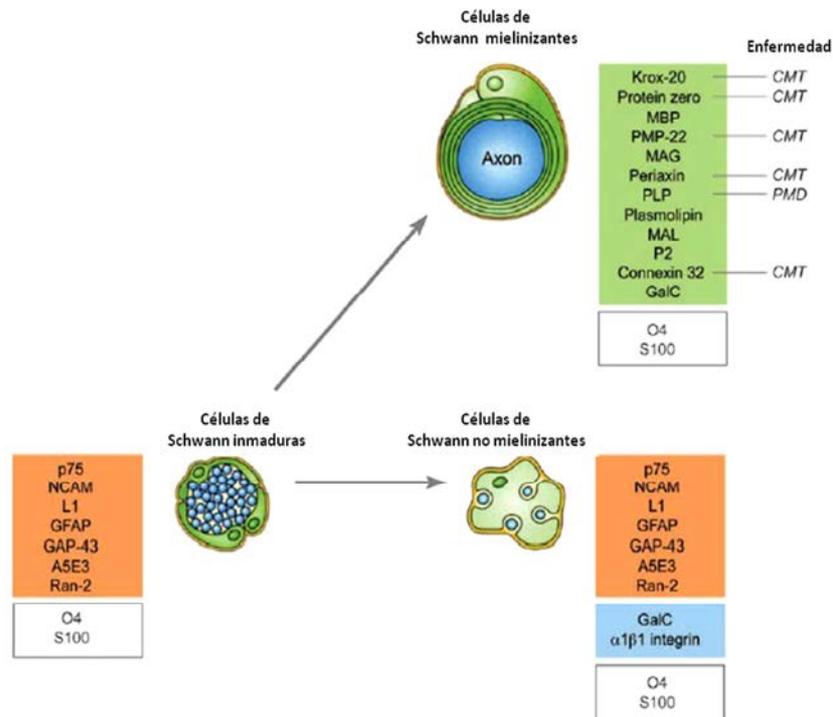
Las células de Schwann que se encuentran cerca de axones largos son capaces de formar capas de membrana alrededor del axón (Bunge et al. 1989); en contra, los axones de menor tamaño están destinados a permanecer desmielinizados e inducen a las células de Schwann a tener un fenotipo de tipo no mielinizante. En mamíferos, la mielinización de los axones largos empieza temprano después del nacimiento y prosigue con la mielinización de axones más pequeños (Martin et al. 1973).

En la **Figura 4** se pueden observar las características fenotípicas de cada tipo celular según el estadio de desarrollo embrionario. Las células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes provienen del mismo precursor celular (célula inmadura de Schwann) que en mamíferos es positiva para la proteína S-100 (proteína de unión de calcio) y O4 en períodos neonatales (Jessen et al. 1991).



**Figura 4.** Características fenotípicas en la transición desde las células de la cresta neural hacia células precursoras de Schwann (SCPs) y células inmaduras de Schwann. En verde se muestran los procesos moleculares descritos para cada uno de los linajes celulares. En amarillo se encuentra descrita la continuidad en la expresión de moléculas por parte de los tres tipos celulares, mientras que los otros paneles muestran moléculas específicas de cada estadio. Nótese que la cadherina 19 (Cad 19) es exclusiva de las células precursoras de Schwann y que la N cadherina es exclusiva de las SCPs y de las células de la cresta neural. ECM: matriz extracelular; NRG-1: neuregulina; FGF: factor de crecimiento fibroblástico; IGF: insulin-like growth factor; ET: endotelina; PDGF: platelet-derived growth factor; GFAP: glial fibrillary acidic protein; AP2α: activator protein 2α; BFABP: brain fatty acid binding-protein; DHH: desert hedgehog; ErbB3: receptores de neuregulina; GAP43: growth-associated protein 43; L1: L1 cell adhesion molecule; Ncad: N cadherina; Oct6: octamer-binding transcription factor 6; O4: antígeno lipídico; PLP: proteolipid protein; PMP22: peripheral myelin protein 22KDA; P<sub>0</sub>: proteína zero. Adaptado de (Jessen et al. 2005).

Existen dos subtipos de células de Schwann maduras que pueden identificarse según la expresión de diversas moléculas (Mirsky et al. 2001b). Las células de Schwann mielinizantes expresan diversas proteínas asociadas a su fenotipo tales como la glicoproteína asociada a la mielina (*Myelin Associated Glycoprotein*, MAG), la proteína de la mielina periférica 22 (*Peripheral Myelin Protein 22*, PMP22), Po (el gen de la mielina proteína zero *mzp* es el mayor componente y el más importante para el proceso de mielinización del SNP) y algunos lípidos (por ejemplo, galactocerebrósidos)(Lemke et al. 1988, Mitchell et al. 1990, Snipes et al. 1992). Las células de Schwann *ensheathing* o no mielinizantes no expresan proteínas asociadas con la vaina de mielina pero sí sintetizan las proteínas *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), *Neural Adhesion Molecule* (NCAM), *Nerve Growth Factor Receptor* (NGFR), *neurotrophin receptor* p75R y la molécula de adhesión L1 y sólo presentan como sinergia con las células mielinizantes la expresión de galactocerebrósidos (Jessen et al. 1994, Jessen et al. 1987, Yu et al. 2009) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Cambios en la expresión molecular de la célula inmadura de Schwann a célula madura mielinizante o no mielinizante. La mielinización comporta la ausencia o presencia de moléculas clave. El panel verde muestra los marcadores de las células mielinizantes. Estas moléculas aumentan se sobre expresan durante el proceso de mielinización. En naranja se muestran los marcadores de las células inmaduras de Schwann. Estas son down reguladas cuando se inician procesos de mielinización pero se mantienen en los fenotipos no mielinizantes. En azul se muestran marcadores específicos de las células no mielinizantes maduras que no se encuentran en las células inmaduras de Schwann. El panel blanco muestra los dos marcadores comunes entre estos tres tipos celulares: O4 y S100. Algunas neuropatías hereditarias presentan una expresión anormal de algunas proteínas implicadas en la mielinización, entre las que se encuentran CMT: Charcot-Marie-Tooth neuropathy y PM: Pelizaeus-Merzbacher disease. Adaptado de (Jessen et al. 2005).

### 1.1.1.1. El proceso de mielinización: la vaina de mielina

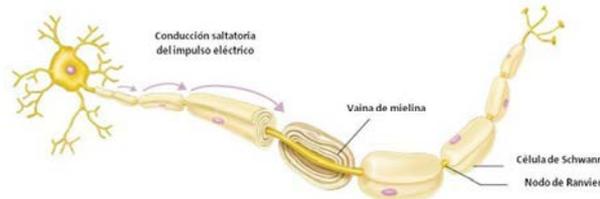
La formación o no de la vaina de mielina depende de dos tipos celulares: las células gliales y las células neuronales (Bunge et al. 1982, Bunge 1993). Uno de los factores más importantes descritos en la maduración de las células de Schwann es la neuregulina 1 (NGR1). Esta molécula liberada por los axones se une a los receptores ErbB2/ErbB3 de las células de Schwann, activando vías de señalización internas como MAPK, PI3K y Akt relacionadas sobre todo con procesos de migración y proliferación previos a la mielinización (Atanasoski et al. 2006, Yamauchi et al. 2004). Las células de Schwann maduras pueden además regular autocrinamente vías de supervivencia a través de la síntesis de moléculas como *Insulin-like growth factor* (IGF), *Platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB) y neurotrofina 3 (NT3) (Jessen et al. 2005). El proceso de mielinización es reversible; ya se postuló en 1975 por Weinberg y Spencer (Spencer et al. 1975) la reversibilidad de los estadios mielinizante-no mielinizante. A pesar del estado maduro de las células de Schwann, estas mantienen la capacidad de diferenciarse y re diferenciarse, estableciéndose nuevos contactos a medida que se generan o regeneran las fibras nerviosas.

Las células de Schwann *ensheathing* o no mielinizantes se encuentran en axones aferentes de neuronas DRG y en axones eferentes de ganglios autónomos, como el ganglio cervical superior. El diámetro de estas fibras suele ser pequeño, de entre 0.4-1  $\mu\text{m}$  (Webster 1993). La célula *ensheathing* no es necesaria para el paso de los impulsos eléctricos por lo que aún se tiene que elucidar cuál es su funcionalidad en el SNP.

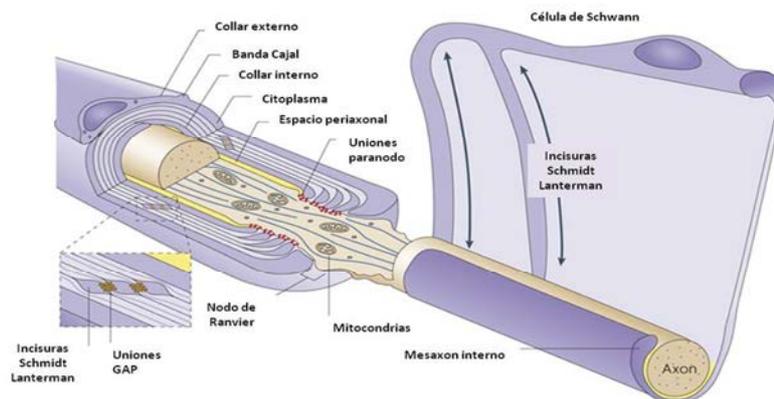
Las células de Schwann mielinizantes están asociadas a neuronas somáticas, sensoriales y autonómicas. Estos axones pueden llegar a tener diámetros de hasta 15  $\mu\text{m}$ . La formación de la vaina de mielina les confiere un diámetro más pequeño que les permite una conducción eléctrica más rápida. La mielinización por parte de las células de Schwann consta de tres fases: la proliferación, la premielinización y la mielinización (Bunge et al. 1982, Bunge 1993). En el proceso de mielinización las células de Schwann elongan su axolema unos 20  $\mu\text{m}$  y este es capaz de enrollarse sobre sí mismo generando vueltas de hasta 18 nm de espesor (Webster 1993). La creación de espirales provoca la aparición de capas unidas entre sí por diversas proteínas formándose uniones de tipo GAP.

Las vainas de mielina están formadas mayoritariamente por lípidos (80-90%) y en menor cantidad por proteínas estructurales (10-20%) (Cammer et al. 1976). La biosíntesis de colesterol es una de las vías más importantes en la mielinización del SNP. El colesterol y los glicoesfingolípidos son los lípidos más abundantes y ambos conforman un 25% del peso lipídico de la mielina. Una de las vías más estudiadas implicadas en la síntesis de colesterol en células de Schwann es la vía a través de receptores de membrana de tipo ErbB sensible a neuregulinas liberadas por los axones (Pertusa et al. 2007). Así, se ha demostrado que ratones *knockout* para vías de síntesis de colesterol han desarrollado graves neuropatías periféricas con hipomielinización en los nervios ciáticos y una disminución de mielina compacta (Saher et al. 2009). Una de las características más importantes de los axones mielinizados es que las células de Schwann se distribuyen a lo largo de estos de forma segmentada, lo

que proporciona aislamiento eléctrico a lo largo del axón favoreciéndose la velocidad de la conducción nerviosa (**Figura 6**) Los segmentos de la membrana axonal se denominan nodos de Ranvier y estas regiones contienen una elevada presencia de canales de sodio y potasio que favorecen la conducción saltatoria de los estímulos eléctricos. En axones mielinizados llega a ser de 10 veces más que en los no mielinizados (Pedraza et al. 2001).



**Figura 6.** Neurona mielinizada por células de Schwann. Las células de Schwann envuelven el axón con vainas de mielina de manera segmentada, dejando entre segmento y segmento partes axonales sin mielinizar llamadas nodos de Ranvier.

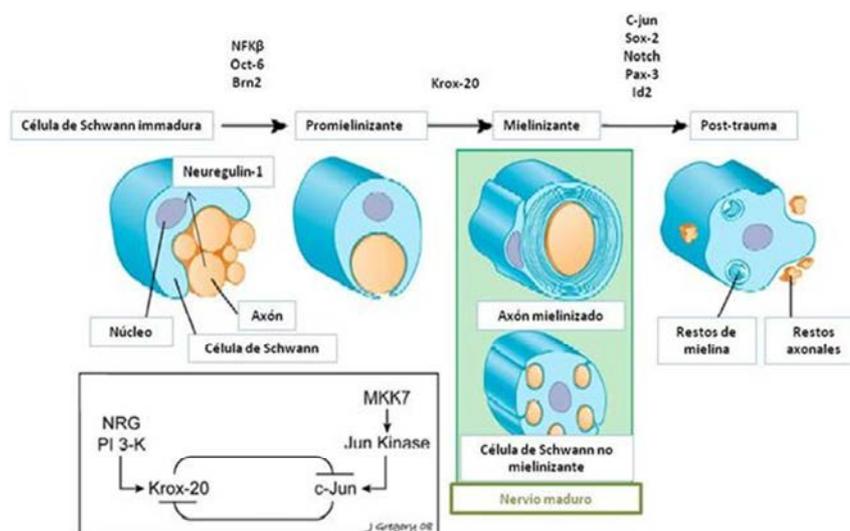


**Figura 7.** Esquema de la estructuración de la vaina de mielina. Se pueden observar partes citoplasmáticas cerca de los nodos de Ranvier y en las incisuras de Schmidt-Lanterman, además de las uniones GAP entre capas. Adaptado de (Nave 2010).

Existen partes de mielina compacta (compuesta por PO, MBP y PMP22) y partes de mielina no compacta en las zonas próximas a los nodos de Ranvier y en las incisuras de Lanterman (con alta presencia de MAG, connexina 32 y E cadherina) (Martini et al. 1998) (**Figura 7**). El contenido citoplasmático de las incisuras de Lanterman permite la comunicación y el intercambio entre el axón y las partes más externas de la célula de Schwann.

### 1.1.1.2. Factores de transcripción implicados en la mielinización

De entre los factores de transcripción establecidos como favorecedores de la mielinización encontramos los siguientes: Krox20, Oct6, Brn2, NFK $\beta$ , SOX10, Nabl1 y 2 (Jessen et al. 2008a) (Figura 10). Está descrito que uno de los factores más importantes es Krox 20 y que este es capaz de regular proteínas tales como Po, MBP, y PMP22 (Nagarajan et al. 2001). Su desregulación se ha visto implicada en la desdiferenciación de las células de Schwann después del daño en el nervio (Zorick et al. 1999). A su vez Oct-6 está implicado en la regulación de la expresión de Krox20 y regula positivamente también la expresión de genes de mielina (Mirsky et al. 2001b).



**Figura 8.** Factores de transcripción involucrados en la mielinización y en la desdiferenciación de la célula de Schwann. La presencia de neuregulina por parte de los axones conlleva a las células de Schwann a adquirir un fenotipo mielinizante. Uno de los factores promielinizantes más importantes descritos ha sido Krox20. Por otro lado, factores como c-jun, Sox-2 y Notch han sido descritos como factores favorecedores de la desdiferenciación de las células de Schwann. En el recuadro se muestran las quinasas que regulan los dos factores (Krox-20 y c-jun) más descritos en este proceso de mielinización y el "crosstalk" que existe entre ellos. NRG: neuregulina; PI3K: PI3 kinasa; MKK7: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7. Adaptado de (Salzer 2008) .

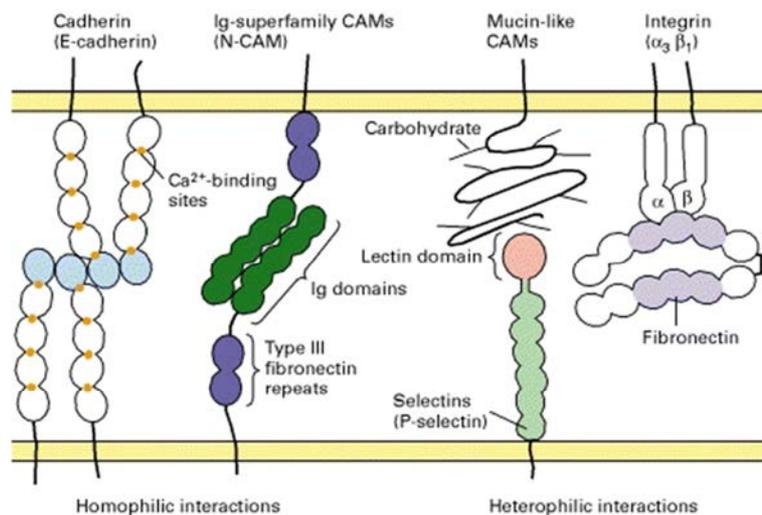
La diferenciación de las células de Schwann puede llevarse a cabo *in vitro* tratando los cultivos con un elevado contenido de AMPc. Los factores que elevan el AMPc intracelular estimulan la expresión de genes relacionados con la mielina (Mews et al. 1993, Sobue et al. 1984). Este hecho es el más estudiado y existe poca información sobre las señales celulares involucradas en la expresión de genes relacionados con la síntesis de mielina. La adición de forskolina en el medio o de dibutyryl cAMP (db-cAMP) resulta en la expresión de proteínas relacionadas con la vaina de mielina y los factores de transcripción Oct6 y Krox20. Por lo tanto, el nivel intracelular de AMPc es de suma importancia en la regulación de dichos genes. Por otro lado, se han descrito factores de transcripción como c-jun que actúan de forma antagónica, aumentando el estado inmaduro de las células de Schwann. De hecho, existe una relación bidireccional entre ambas vías (**Figura 8**), ya que se ha descrito que Krox20 es capaz de regular a su vez la expresión de los factores c-jun (Parkinson et al. 2004). Los mismos autores

describen en un modelo animal que en presencia de daño hay una disminución de la expresión de Krox-20 y un aumento de la expresión de c- jun.

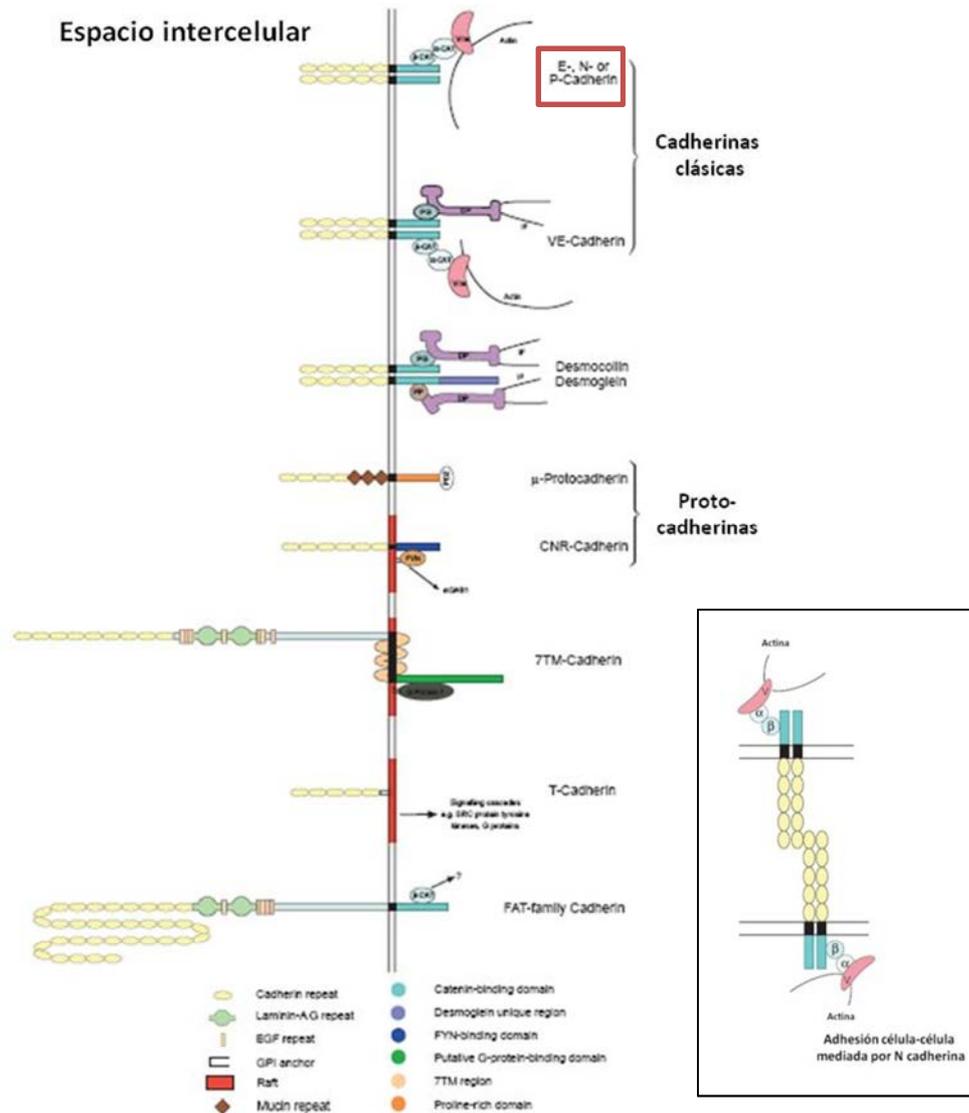
Otras vías de señalización implicadas en procesos de desmielinización han sido descritas. Se han observado retrasos en la mielinización en ratones con inactivación de *Toll Receptors*, *Nitric Oxid Sintasa*, fosfolipasa 2A y metaloproteasa 9 (Boivin et al. 2007, Boivin et al. 2007, Keilhoff et al. 2002, Chattopadhyay et al. 2007). La regulación negativa de la diferenciación emerge como un mecanismo importante para entender la plasticidad, las patologías desmielinizantes, respuestas a daño y regeneración; además de la regulación del desarrollo. Otras señalizaciones mediadas por ERK1/2 activado y Notch han sido implicados en el control negativo de la formación de la mielina (Woodhoo et al. 2008, Harrisingh et al. 2004, Ogata et al. 2004, Le Mee et al. 2005a).

### 1.1.1.3. Uniones adherentes en las células de Schwann: papel de la N cadherina

La organización espacial y funcional de las células que conforman los tejidos vienen determinadas por las adhesiones entre célula-célula a través de diversas moléculas de adhesión (CAMs) (Hansen et al. 2008). Éstas vienen iniciadas mayoritariamente por las interacciones entre los dominios extracelulares de la familia de las cadherinas y su relación con el citoesqueleto intracelular de actina (**Figura 9**).



**Figura 9.** Familias de moléculas implicadas en adhesión intercelular. Las familias de las cadherinas y de las inmunoglobulinas conforman las adhesiones homofílicas entre células. La unión de  $Ca^{2+}$  en las cinco repeticiones extracelulares de las cadherinas es necesaria para la correcta adhesión; el extremo N terminal (en azul) es necesario para la dimerización y la unión con la cadherina opuesta. La familia Ig contiene múltiples dominios similares a las inmunoglobulinas (en verde) y normalmente poseen repeticiones de fibronectina (en lila). En las interacciones heterofílicas, el dominio de lectina de las selectinas se unen a las cadenas de carbohidratos de de las "mucin-like CAMs" en presencia de calcio. La mayor representante de moléculas de adhesión entre las células y la matriz extracelular es la integrina, un heterodímero con dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ), ésta se une a la fibronectina, laminina u otras moléculas de la matriz extracelular.

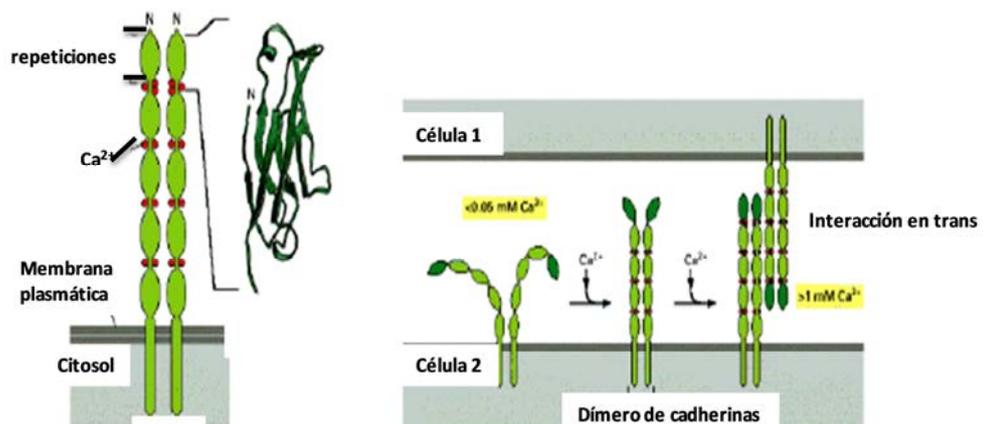


**Figura 10.** Representación de las diversas familias de cadherinas. A la derecha esquema de las uniones adherentes mediadas por N-cadherina;  $\beta$ :  $\beta$  catenina;  $\alpha$ :  $\alpha$  catenina. Pg: plakoglobin; PP: Plakophilin; Vin: vinculina; IF: filamento intermedio; DP: Desmoplakin. En el recuadro rojo se indican tres de las cadherinas clásicas más estudiadas.

Las cadherinas clásicas forman una familia de glicoproteínas monoméricas con dominio transmembrana que intervienen en la formación de adhesiones homofílicas entre células de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 10**). La mayoría contienen 5 repeticiones extracelulares dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y una secuencia formada por His-Ala-Val (HAV) que contribuye a la adhesión y a la especificidad de unión. Esta unión extracelular de los dominios extracelulares es débil, y se refuerza con la formación de *clusters* laterales constituidos por los dominios citoplasmáticos de las cadherinas y el citoesqueleto de actina (Jamora et al. 2002). Las cadherinas clásicas más estudiadas han sido la E-cadherina (presente en células epiteliales); la N-cadherina (presente en células nerviosas y musculares), y la P-cadherina (presente en placenta y en epidermis). En ausencia de calcio extracelular las cadherinas sufren cambios

conformacionales importantes y son rápidamente degradadas por enzimas proteolíticas (**Figura 11**).

De entre todas las cadherinas, las más caracterizadas son la E cadherina y la N cadherina (Yap et al. 1997). Fue a principios de los 80 cuando se describió por primera vez la E cadherina (uvomorulin), una glicoproteína que estaba involucrada en compactación. Más tarde, otra cadherina dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (N cadherina) fue clonada y analizada (Schuh et al. 1986). Ambas fueron clasificadas como miembros de la familia de las cadherinas clásicas dependientes de calcio extracelular. A partir de entonces muchas otras cadherinas han sido descubiertas y no sólo se han relacionado con la adhesión celular, sino también con múltiples procesos biológicos vinculados a la morfogénesis, organización citoesquelética y migración, además de procesos patológicos como la metástasis (Christofori et al. 1999). Las cadherinas están estrechamente asociadas con una familia de proteínas citoplasmáticas llamada cateninas:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  catenina. Éstas a su vez, se encuentran asociadas a proteínas citoesqueléticas como la actina. Debido a estas interacciones, las alteraciones de las uniones adherentes pueden conllevar a una alteración de la estructura celular y tisular. Las funciones de las cateninas no sólo son estructurales sino que también pueden participar como factores de transcripción. Cuando la  $\beta$  catenina forma exclusivamente parte de la estructura del citoesqueleto de actina de la célula, la  $\beta$  catenina no unida es rápidamente degradada por el sistema ubiquitina-proteasoma. Pero la estabilización de la  $\beta$  catenina por parte de la señalización de *Wnt* conduce a que ésta pueda acumularse al núcleo y actúe como factor de transcripción. El papel de  $\beta$  catenina como factor de transcripción ha sido bien estudiado en el desarrollo embrionario, pero su sobreexpresión o activación aberrante en adulto se ha correlacionado con una contribución a la progresión del cáncer por aumentar la proliferación celular.



**Figura 11.** A la izquierda representación esquemática de una cadherina clásica dependiente de calcio. Se muestran las 5 repeticiones que componen el dominio extracelular y en rojo las moléculas de calcio unidas. En presencia de bajas concentraciones de calcio extracelular ( $<0.05 \text{ mM}$ ) las cadherinas cambian de conformación y suelen ser degradadas. En presencia de calcio extracelular pueden estructurarse en dímeros e interactuar en trans con cadherinas adyacentes.

*Neural cadherin* o N cadherina es una molécula de adhesión involucrada en muchos procesos que incluyen el contacto glia-glia, e interacciones entre el axón y la glía (Takeichi 2007, Perez et al. 2004). Esta glicoproteína de superficie pesa unos 130 KDa y se expresa tanto en neuronas como en células gliales en el SNP y el SNC (Tomaselli et al. 1988, Wilby et al. 1999, Lakatos et al. 2000, Wanner et al. 2002, Fairless et al. 2005, Wanner et al. 2006b, Kanemaru et al. 2007). Se ha visto involucrada en muchos procesos de adhesión intercelulares, diferenciación, embriogénesis, migración, invasión y plasticidad sináptica (formación de dendritas) (Derycke et al. 2004, Okamura et al. 2004). Además, su expresión es de gran importancia en el alineamiento entre las células de Schwann y los axones, por lo tanto su presencia es de vital importancia en los primeros contactos entre ambas células (Wanner et al. 2002). Muchos estudios han relacionado su expresión con procesos de neurulación, ya que han observado que su inhibición provoca problemas en la correcta formación del cerebro (Lee et al. 2007, Arikath 2010).

En las incisuras que conforman las células de Schwann con los axones se han encontrado una gran variedad de moléculas de adhesión entre las cuales encontramos sobretodo moléculas de la familia de las inmunoglobulinas como MAG y neurofascina (Trapp et al. 1989). Las células mielinizantes contienen la mayoría de adhesiones descritas para células epiteliales, de forma que encontramos desde *tight junctions*, *Gap junctions* y uniones adherentes (Mugnaini et al. 1974, Fannon et al. 1995, Balice-Gordon et al. 1998). Estas uniones pueden ser autotípicas (en la misma célula de Schwann) o heterotípicas entre los axones y las células de Schwann o entre las células de Schwann y la lámina basal. En las células de Schwann maduras la cadherina más importante es la E cadherina que juntamente con sus *moléculas asociadas* citoplasmáticas, cateninas y F actina se localiza principalmente en los compartimentos citoplasmáticos de Schmidt-Lanterman (Crawford et al. 2008). N cadherina se expresa sobre todo en las células precursoras de Schwann. En el transcurso de célula precursora a célula inmadura de Schwann la N cadherina se encuentra *en* menor presencia *in vivo* y coincide con los cambios citoarquitectónicos de los nervios (Wanner et al. 2006c). Además, como se ha comentado anteriormente, otra cadherina, la Cadherina 19 también es altamente expresada en células precursoras de Schwann (Takahashi et al. 2005), postulando que ambas pueden tener funciones parecidas en el inicio de mielinización (Woodhoo et al. 2008).

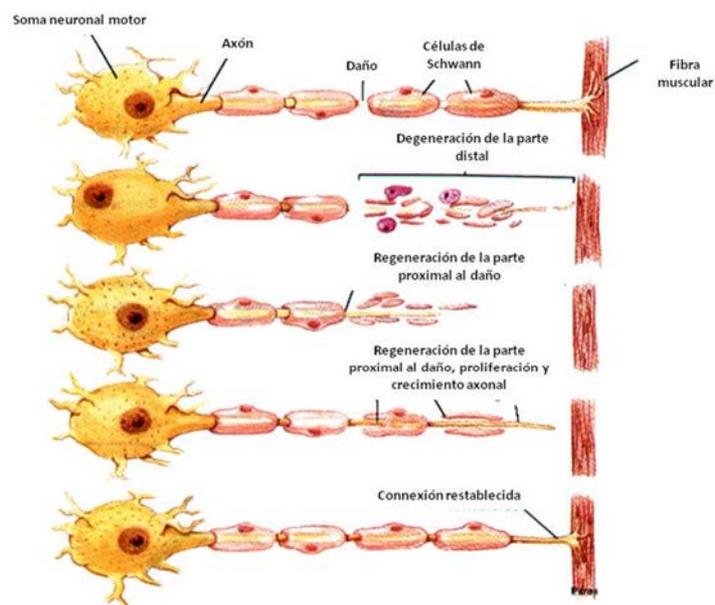
No existe mucha información sobre cuáles son los factores y mecanismos que regulan la expresión de N cadherina en células neuronales. Algunos estudios correlacionan la expresión de N cadherina con los genes *twist* y *snail* durante la gastrulación en el modelo de *Drosophila* (Oda et al. 1998). En condrocitos se ha observado que el factor de transcripción Sox 9 es capaz de regular el promotor de N cadherina (Panda et al. 2001), y que los esteroides gonadales aumentan los niveles de mRNA en el hipocampo de rata y en neuronas motoras (Monks et al. 2001). En estudios con células de Schwann se ha visto la implicación de las moléculas heregulina y neuregulina en su expresión (Wanner et al. 2006c).

La señalización purinérgica puede ser importante en la regulación de la expresión y la función de N cadherina a nivel transcripcional ya que en un trabajo reciente Minh Tran (2008) (Tran et al. 2008a) se ha descrito que el ATP y el UTP extracelulares inducen en

células astrocíticas un aumento en la expresión de N cadherina a través de receptores P2Y y P1; y que su expresión depende de la actividad de las quinasas ERK y Akt. Otras moléculas de adhesión, aparte de N cadherina, se han visto incrementadas en presencia de nucleótidos extracelulares, así encontramos aumentos de Thrombospondin-1, proteína de la matriz extracelular que promueve sinaptogenesis (Tran et al. 2006) y VCAM en células endoteliales a través del receptor P2Y2 (Seye et al. 2004).

#### 1.1.1.4. Papel de las células de Schwann en el daño y la reparación axonal

El SNP tiene la capacidad de regenerar el tejido dañado en parte o en su totalidad cuando se presentan lesiones nerviosas (**Figura 12**) mientras que el SNC no tiene la capacidad de regenerar y el tejido dañado es normalmente fagocitado por células de la microglía circundante ocupándose el lugar dañado por astrocitos (Navarro et al. 2009). Las lesiones en los axones neuronales periféricos conlleva un seguido de procesos degenerativos que afectan los segmentos distales (zonas inferiores de la zona de la lesión), el segmento proximal (parte superior de la zona de la lesión) e incluso puede llegar afectar a los somas neuronales provocando apoptosis.



**Figura 12.** Proceso de regeneración de una fibra nerviosa periférica. Normalmente se inicia el daño en la parte distal de la fibra nerviosa. La regeneración empieza en la zona proximal de la zona dañada hasta conseguir el restablecimiento de la conexión.

La lesión en el nervio conlleva una rotura de las fibras nerviosas, la interrupción de los axones que las conforman y una desdiferenciación de las células de Schwann colindantes iniciándose lo que denominamos degeneración *Walleriana*. Cuando un nervio periférico se rompe, la vaina de mielina y el axón se desintegran. Las células de Schwann residentes y los macrófagos reclutados son los encargados de remover desechos axonales y los restos de mielina (Stoll et al. 1999, Stoll et al. 1989). La primera parte afectada es la distal a la lesión, los axones presentan inflamación y desestructuración del citoesqueleto y las células de Schwann circundantes a la zona de la lesión secretan moléculas pro inflamatorias como interleuquinas y citoquinas que

atraen la llegada de macrófagos, favoreciendo la fagocitación de gotas lipídicas procedentes de la vaina expulsadas por las mismas células de Schwann afectadas (Vargas et al. 2007) .

En estos procesos de regeneración es importante que se mantenga la estructura del endoneuro y que las células de Schwann se desdiferencien y proliferen. Se ha observado que después de la lesión hay una persistencia de una membrana basal en el nervio. Encima de esta membrana basal se sitúan las células de Schwann y éstas entran en proliferación hasta las dos semanas posteriores a la lesión (Stoll et al. 1999, Griffin et al. 1990). Las estructuras que forman estas células de encima de la membrana basal se denominan bandas de *Bügnner*. Los axones empiezan a formar varias ramificaciones o conos de regeneración, se disponen cerca de las ya comentadas bandas de *Bügnner* y empiezan a regenerar. Se evidencia pues la existencia de muchos factores difusibles que influyen no sólo las células de Schwann, sino también las células de Schwann no mielinizantes, fibroblastos y células perineurales.

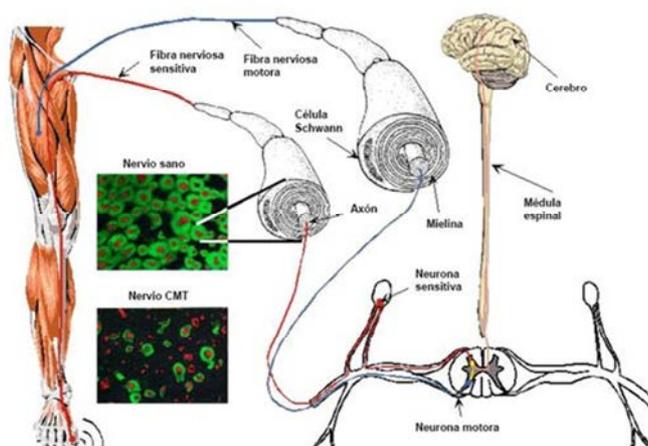
Fenotípicamente, las células de Schwann en procesos de daño reducen la síntesis de constituyentes de mielina, entre ellos Po, MBP y galactocerebrósidos. Junto con la pérdida de marcadores fenotípicos, las células de Schwann en la zona distal empiezan a sintetizar factores tróficos, entre los que encontramos *Neural Growth Factor* (NGF) (Heumann et al. 1987), *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) (Acheson et al. 1991), *neurotrophin 3*, *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), *platelet-derived growth factors* (PDGF); moléculas de adhesión (surface adhesion molecules, CAMs) como N-CAM, Mg-CAM, N cadherin y L2/HNK-1 y componentes de la lámina basal como laminina, tensacina y fibronectina (Ebadi et al. 1997). A su vez, los axones regulan los niveles de expresión de receptores sensibles a los diversos factores tróficos secretados por las células de Schwann (Ebadi et al. 1997). La mayor parte de señalizaciones intracelulares que provienen de la estimulación de dichos receptores convergen en la activación de la vía PI3K la cual fosforila e inactiva GSK3 y favorece el crecimiento axonal (Chen et al. 2011).

### 2.1. Las neuropatías periféricas

Las neuropatías periféricas implican alteraciones a nivel de SNP. Hasta el momento se han descrito más de 100 neuropatías periféricas diferentes. Dependiendo del nervio afectado (motor, sensorial o autónomo) las alteraciones y los síntomas varían de un paciente a otro. Normalmente en los inicios de las fisiopatologías periféricas se ven afectados los nervios sensoriales asociados a dolor, presión o temperatura. Los síntomas que aparecen a los pacientes suelen traducirse en hormigueos, dolor y calor sobre todo en las extremidades inferiores. La incidencia varía según el tipo, por ejemplo, las neuropatías de origen diabético tienen una incidencia de un 2-3% en la población mundial, afectando en el caso de Estados Unidos a más de 6 millones de personas. Este elevado índice seguramente revela la alta y creciente incidencia de personas diabéticas a nivel mundial.

Las causas de la neuropatía periférica pueden darse por una lesión del nervio, por un trauma, tumores, toxinas, respuestas autoinmunes, deficiencias nutricionales, desordenes vasculares y metabólicos e incluso por alcoholismo.

Se pueden diferenciar entre neuropatías adquiridas y neuropatías hereditarias. Las neuropatías adquiridas están causadas por enfermedades sistémicas como diabetes, causas traumáticas (calor, frío, o radiaciones), infecciones o enfermedades autoinmunes como Charcot Marie Tooth o Guillain-Barré (**Figura 13**). Por otro lado, las neuropatías hereditarias son debidas en parte a mutaciones genéticas. Se caracterizan por ser neuropatías crónicas que dan lugar a una degeneración progresiva importante en el movimiento, en los sentidos y debilidad general muscular. Algunos genes asociados a la neuropatía de origen hereditario son la connexina 32, PMP22, PLP o P0 (Suter et al. 2003). El diagnóstico de la neuropatía periférica se realiza mediante pruebas que evalúan los reflejos y la capacidad de respuesta a temperatura y vibración del paciente diabético en pies y piernas.



**Figura 13.** Esquema de las vías nerviosas eferentes motoras y las vías nerviosas aferentes sensitivas. Visualización por inmunocitoquímica de procesos de desmielinización de fibras sensoriales en un paciente con Charcot Marie Tooth (CMT).

El tipo de neuropatía más frecuente es el que se presenta en pacientes con diabetes *mellitus* (DMT). La diabetes *mellitus* es un trastorno multisistémico y multifuncional que se caracteriza por la alta presencia de glucosa en sangre (hiperglucemia). Es una de las enfermedades que más prevalencia

tiene en la sociedad actual. Debido a sus complicaciones y su carácter crónico, reduce la esperanza de vida de los que la padecen. En los últimos 50 años, la enfermedad ha ido en aumento hasta llegar a presentarse en un 5% de la población por lo que se inducirá a su vez un aumento de pacientes con neuropatías periféricas (Atkinson et al. 2001).

Las complicaciones se dividen en microangiopáticas (dónde encontraríamos las neuropatías, retinopatía y nefropatía diabética) y complicaciones macroangiopáticas (cardiopatías isquémicas, arteriosclerosis cerebral y enfermedad vascular periférica). La más frecuente de ellas (hasta un 60 % de los pacientes con diabetes) y común es la aparición de neuropatías periféricas. Estas neuropatías se traducen en la aparición de daño tanto en nervios somáticos como en nervios autónomos. Aunque los pacientes reciban tratamientos de insulina, la aparición de neuropatías puede ser igual de significativa. La hiperglucemia induce estrés oxidativo en las neuronas y se traduce en una activación de diferentes rutas bioquímicas, por ello, el estudio de estas rutas es de suma importancia para la creación de tratamientos más efectivos. A pesar de ello, los fármacos que de momento se suelen administrar son sólo paliativos del dolor. No sólo se cree que el agente causal sean los altos niveles de azúcar, también la baja presencia de insulina en sangre, la presencia de daño en los vasos sanguíneos, inflamación de los nervios, enfermedades relacionadas con el sistema nervioso o hábitos como fumar y beber, podrían estar aumentando la presencia de daño axonal.

#### **2.1.1. Tratamientos de las neuropatías**

La mayoría de tratamientos para las neuropatías periféricas son sintomáticos. El correcto control que causa la neuropatía es la base para la correcta regeneración de los axones dañados, así en las neuropatías de origen diabético, el control de la hiperglucemia sería de suma importancia. Por otro lado, se administran también tratamientos eléctricos para aumentar la regeneración de los nervios (Zochodne 2000).

El campo más estudiado y en el que encontramos la mayoría de los fármacos para el tratamiento de las neuropatías, es el campo de las terapias sintomáticas. Estos fármacos normalmente actúan a nivel de SNC y suelen ser antidepresivos o antiepilépticos (gabapentina o el valproato sódico), agentes tricíclicos o tetracíclicos (amitriptilina), inhibidores selectivos del consumo de la serotonina, anticonvulsivos, ligandos de canales de calcio, opiáceos, cannabinoides, fármacos no esteroideos anti-inflamatorios, antagonistas de los receptores de N-methyl-D-aspartato, etc.

Como se ha comentado anteriormente la causa principal con la que se asocia la aparición de daño axonal en el caso de la diabetes es la alta concentración de azúcar en sangre, lo que se traduce en un estrés oxidativo de las neuronas y la glía del SNP. Se han diseñado fármacos que tienen como diana algunas de las vías metabólicas afectadas. En la **Tabla 1** se muestra de forma resumida algunas de las vías alteradas y algunos fármacos diseñados para evitar la presencia de neuropatías periféricas en pacientes con diabetes que las revierten.

Vía metabólica	Alteración	Efectos	Fármacos
Vía del poliol	La glucosa es metabolizada por la AR+NADPH a [sorbitol]i. También aumenta la presencia de [fructosa]j	Shock osmótico/AR puede activar MAPK, PARP, NOS y moléculas inflamatorias=estrés celular (Marina, 2010)	Inhibidor de la AR: sorbinil, zenarestat. (no efectivos en modelos animales, Cameron 2005)
Vía de las hexosaminas	Alteración de la ratio glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) por ausencia del cofactor NADPH. Aumento del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracelular	Estrés oxidativo	Benfotiamina
Cadena de transporte electrónico mitocondrial	Glucosa altera membrana mitocondrial. Aumento de radicales superóxido O <sup>2-</sup> (Srinivasari, 2000, Brownlee 2001)	Estrés oxidativo	Antioxidantes: Vitamina E, ácido lipoico, resveratrol
Glucólisis	Aumento de la fructosa-6P que puede convertirse a UDP-GLcNad	Unión del UDP-GLcNad a residuos Ser/Thr de FT, alteración proteica	-----
Aumento del DAG	Activación de PKC	Estrés celular	Inhibidores de PKCβ (ruboxitsaurin, efectivo en retinopatías diabéticas)
Aparición reacciones no enzimáticas entre azúcares-proteínas/nudeótidos o lípidos.	Generación de EGAs y AGES	Alteración de proteínas intracelulares. Activación de vías a través de RAGES	Inhibidores de AGES/RAGES: aspirina, aminoguanidine

**Tabla 1.** Fármacos diseñados según la vía metabólica celular alterada por la alta presencia de glucosa en sangre. AR: Aldosa Reductasa; MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase, PARP: Poly ADP Ribose Polimerase; NOS: óxido-nítrico sintasa; UDP-GLcNad: Uridine diphosphate N-acetylglucosamine Ser/Thr: serina, threonina; FT: factor de transcripción; PKC: proteína kinasa C, EGAs: Early Glycation Adducts; AGES: Advanced Glycation End Products, RAGES: Receptores de AGES; DAG: diacilglicerol.

A pesar de los estudios que tienen como diana diferentes componentes de las vías metabólicas afectadas, los últimos trabajos sobre la búsqueda de tratamientos se basan en terapias génicas con vectores víricos que codifican factores de crecimiento, entre los que encontramos por ejemplo IGF-1 o NT3. Estudios *in vivo* con modelos animales han demostrado además que la neurotrofina 3 puede llegar a revertir los procesos de desmielinización (Homs et al. 2011) .

#### 2.1.1.1. El fármaco Núcleo CMP Forte®

El fármaco Núcleo CMP forte® (CMPF) está compuesto por citidina monofosfato (CMP), uridina monofosfato (UMP), uridina difosfato (UDP) y uridina trifosfato (UTP) (**Figura 14**). Se prescribe a pacientes que presentan problemas ciáticos, lumbalgias, neuralgias en el nervio trigémino, neuritis, neuropatías diabéticas, neuropatías de origen infeccioso, de origen metabólico y de origen osteoarticular, polineuritis, radiculitis y tortículis (**Tabla 2**). Se suele administrar como fármaco complementario al tratamiento sintomático del dolor.

Afecciones más frecuentes en el SNP	Causas	Origen	Síntomas	Tratamientos sintomáticos del dolor
Afecciones relacionadas con procesos inflamatorios				
Neuritis	Termino general para la inflamación de un nervio	Lesiones físicas, infección (Herpes simplex, Lepra, Síndrome de Guillain Barré), enfermedad de Lyme, lesiones químicas o radiaciones.	Dolor, parestesias (síntomas de alfileres y agujas), parestesia (debilidad), hipoestesia (adormecimiento), anestesia, parálisis, pérdida y desaparición de los reflejos.	Antiinflamatorios (AINEs)
Ciática (neuritis ciática)	Compresión de los nervios lumbares, de los nervios sacros o del nervio ciático en sí (menos frecuente). Cuando se comprime una raíz nerviosa dorsal se considera radiculitis (con procesos inflamatorios)	Mecánicos, debido embarazo, hábitos posturales	Entumecimiento pies o piernas, alteración de reflejos y debilidad.	Antiinflamatorios (AINEs), narcóticos (dolor), quiropráctica
Disfunción generalizada de los nervios periféricos				
Neuropatías periféricas	Disfunciones en los nervios periféricos.	Enfermedades genéticas (CMT), metabólicas endocrinas (diabetes, insuficiencia renal, porfiria, amiloidosis, insuficiencia hepática, hipotiroidismo), tóxicos (metales, consumo excesivo B6, fluoroquinolona), enfermedades inflamatorias (S <sup>o</sup> Guillain Barré, lupus, Lyme..). Deficiencias de vitaminas, quimioterapia, radiaciones, VIH...	Entumecimiento, temblor y trastorno de la marcha, sensación de hormigueo, dolor, picazón, hormigueo y pinchazos., cansancio.	Opiáceos, antidepresivos, agentes tricíclicos, anticonvulsivos, AINEs...
Afecciones relacionadas con dolor				
Neuralgias en el nervio trigémino	Afección dolorosa crónica del nervio trigémino o 5th nervio craneal.	Compresión del nervio por parte de vasos sanguíneos	Ardor, dolor facial	Anticonvulsivos, antidepresivos tricíclicos.
Lumbalgia	Trastornos relacionados con las vértebras lumbares y las estructuras de los tejidos blandos como músculos, ligamentos, nervios y discos intervertebrales.	Sobreesfuerzo físico, postural- puede ser un síntoma de enfermedades genéticas como el síndrome de Ehlers-Danlos y el Síndrome de Hiperlaxitud articular.	Dolor en la parte inferior de la espalda. En casos agudos pueden verse afectados los tejidos blandos.	Analgésicos, opiáceos, antiinflamatorios, miorelajantes, antidepresivos, toxina botulínica, neuroestimulaciones.

**Tabla 2.** Resumen de las afecciones más frecuentes en el SNP. Se detallan las causas, origen y algunos de los tratamientos posibles para cada una de ellas. CMT: Charcot Marie Tooth Syndrome.

En 1972 se objetivaron los posibles efectos beneficiosos de la asociación de CMP/UTP en diversas neuropatías periféricas. En este caso, los nucleótidos se administraban juntamente con la vitamina B12. Los resultados mostraron un rápido alivio del dolor asociado principalmente en los casos de neuropatía diabética, neuritis aguda y radiculopatías. Así mismo, se evidenció una recuperación motora en los casos de neuropatía diabética, mononeuropatías y neuropatías relacionadas con alcoholismo. Los autores concluyeron que la administración del Núcleo (asociado con la vitamina B12) aceleraba la recuperación de neuropatías, mejorando el dolor y la alteración motora asociadas.

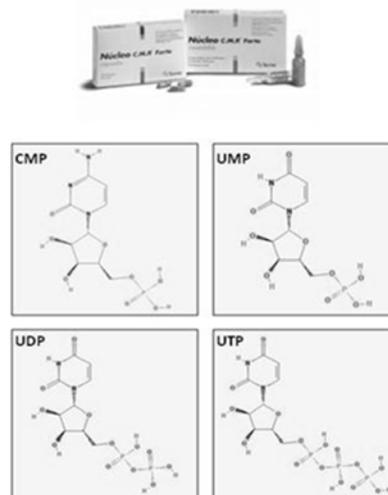
Estudios llevados a cabo por Castilla-Garrido en 1973 evaluaron la efectividad de los mismos componentes (CMP, UTP y vitamina B12) en neuropatías de origen diverso (traumática, tóxica, infecciosa, metabólica, degenerativa o idiopática). En un 90 % de los pacientes se encontraron mejorías.

En estudios posteriores realizados en 1992 con modelos animales a los que se les había administrado UMP y CMP se demostró mediante resultados electroneurofisiológicos y morfométricos, una mejoría en la conducción y en la estructuración de las fibras nerviosas (Wattig et al. 1992a, Wattig et al. 1992b). En el mismo año, mediante estudios clínicos, se observó que el tratamiento con uridina en pacientes con neuropatías provocaba mejorías neurofisiológicas a los 6 meses de tratamiento (Gallai et al. 1992); además en un estudio realizado en pacientes con paraparesis espástica a los cuales se les había administrado CMP y UMP, también se observaron mejorías sin provocar efectos secundarios (Cartier et al. 1996).

Resultados obtenidos mediante estudios clínicos posteriores realizados entre 2000 y 2002 con pacientes que presentaban polineuropatías, se observó que el tratamiento durante tres meses con el fármaco Keltican (nombre anterior del fármaco CMPF) comportaba notables mejorías (según parámetros establecidos en el *Neuropathy Disability Score*, NDS); observándose un incremento en la velocidad de la conducción eléctrica y una disminución en la sensibilidad al dolor de forma significativa (Muller 2002).

En 2007, estudios llevados a cabo por Voloshina et al, evaluaron la efectividad y seguridad del Núcleo CMP Forte en el tratamiento de neurorradiculopatías localizadas en zonas cervicales, torácicas, lumbosacrales. La eficacia se valoró mediante la evaluación del alivio del dolor, y la valoración subjetiva del paciente. Los resultados mostraron que de los 19 pacientes tratados, 16 presentaban "considerable o moderada mejoría", 2 "mejoría insignificante" y 1 el dolor le desapareció.

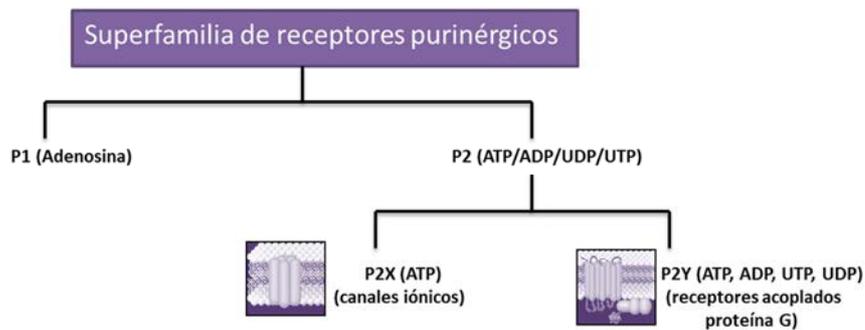
En ninguno de los trabajos anteriores pero, se estudió la implicación y los mecanismos moleculares de actuación del fármaco, por lo que es de gran importancia un estudio sobre los efectos que tienen los nucleótidos en las fibras nerviosas periféricas.



**Figura 14.** Componentes del fármaco CMP Forte®.

### 3. LOS NUCLEÓTIDOS COMO SEÑAL DE COMUNICACIÓN CELULAR

Los nucleótidos, además de presentar múltiples funciones intracelulares, entre las cuales encontramos la síntesis de DNA y RNA, son capaces de actuar como mensajeros, estableciendo comunicaciones intercelulares. Debido a que éstos son hidrofílicos, estas comunicaciones vienen dadas mayoritariamente a través de la activación de receptores purinérgicos de tipo P2X y P2Y (**Figura 15**). Ambas subclases se expresan en abundancia en el sistema nervioso, dónde están presentes tanto en neuronas como en células gliales. Actualmente, los receptores purinérgicos se han visto implicados en varias patologías del sistema nervioso, por lo que pueden llegar a ser potenciales dianas terapéuticas.



**Figura 15.** Familia de receptores purinérgicos clasificados según la sensibilidad a nucleótidos. Los receptores P1 son sensibles a adenosina, mientras que los receptores P2 son sensibles a ATP, ADP, UDP y UTP. Los receptores P2 se dividen en dos subfamilias: P2X (canales iónicos sensibles a ATP) y P2Y (receptores metabotrópicos sensibles a nucleótidos de adenina y uridina).

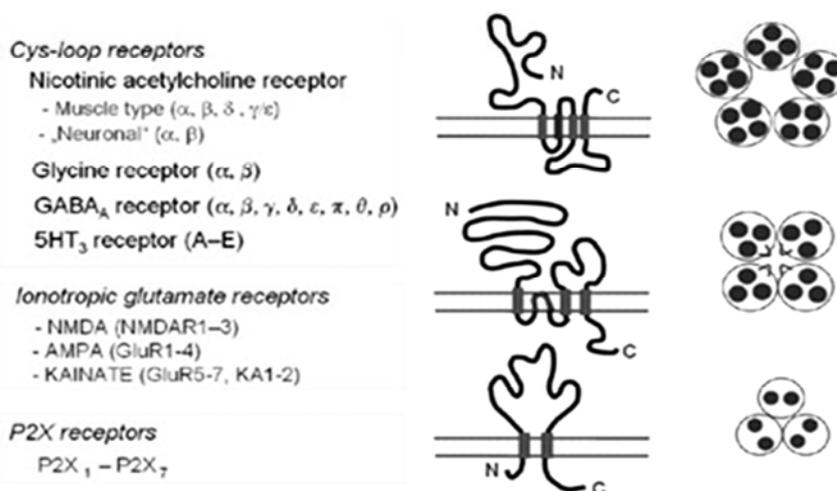
#### 3.1. Los receptores purinérgicos

Los receptores purinérgicos se describieron por primera vez en 1976. Tras varios estudios fisiológicos y farmacológicos se clasificaron en dos categorías principales: los receptores P1 y los receptores P2 (Burnstock et al. 1995). Los receptores denominados P1 presentan como ligando la adenosina y modulan la actividad de la adenilato ciclasa; por otro lado, los receptores de tipo P2 son sensibles a ATP y UTP mayoritariamente y modulan la señalización de PLC y la concentración intracelular de calcio. Existen 4 tipos de receptores P1 (A1, A2A, A2B, A3) y 15 tipos de receptores P2 (Fredholm et al. 1994) Estos últimos a su vez se clasifican en dos grandes familias: los receptores ionotrópicos P2X y los receptores metabotrópicos P2Y.

##### 3.1.1. Los receptores purinérgicos P2X

Los receptores P2X son canales iónicos insertados en la membrana plasmática que se activan por la unión del ATP extracelular; una vez activados permiten el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ). Forman parte de una de las tres grandes familias descritas de canales iónicos (**Figura 16**).

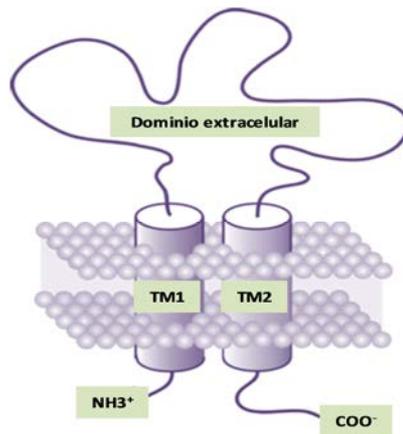
## Familias de canales iónicos



**Figura 16.** Familias de canales iónicos según su topología. Se muestran las tres familias mayoritarias de canales iónicos. Por un lado se muestran los receptores cys-loop que forman la familia más estudiada y mayoritaria: los receptores-like nicotínicos. Se estructuran como pentámeros y poseen cuatro dominios transmembrana por subunidad. Miembros de esta familia son los receptores nicotínicos acetilcolina (nAChR) y el 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor (los dos catiónicos), y por otro lado GABA<sub>A</sub> aminobutyric acid y receptores de glicina, ambos anion-selectivos. En segundo lugar, el glutamato, el mayor transmisor excitatorio del cerebro humano, abasta una amplia familia de canales selectivos de catión, dónde encontramos los receptores AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate), NMDA (N-methyl-D-aspartate) y receptores de kainato. Todos ellos poseen tres dominios transmembrana por subunidad. Por último, se muestran los receptores P2X, estructurados con dos segmentos transmembrana, un gran bucle extracelular y los dos extremos (N y C terminal intracelulares).

Los receptores P2X poseen dos segmentos hidrofóbicos (TM1 y TM2) que atraviesan la membrana plasmática. Tanto el extremo N-terminal como el extremo C-terminal son intracelulares. De receptores ionotrópicos P2X se han descrito siete subtipos diferentes (P2X1-P2X7), presentando entre ellos una homología de hasta el 50 %. Se postula que los receptores P2X están formados por el ensamblaje de varias subunidades que se estructuran básicamente en trímeros (Barrera et al. 2008, Ding et al. 1999). Estos subtipos se ensamblan formando homo o hetero-oligómeros que dan lugar a canales funcionales (**Figura 17**).

Todos los receptores P2X son permeables a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y con mayor afinidad a los iones de Ca<sup>2+</sup> (Gourine et al. 2009, Fischer et al. 2009). La principal consecuencia de activación de los receptores P2X es un incremento transitorio de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular libre debido a una despolarización de la membrana que induce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que se suma a la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través del propio canal P2X. El incremento de calcio intracelular provoca a su vez la activación de MAPK, PKC y calmodulina (Fountain et al. 2009, Erb et al. 2006, Leon et al. 2006).

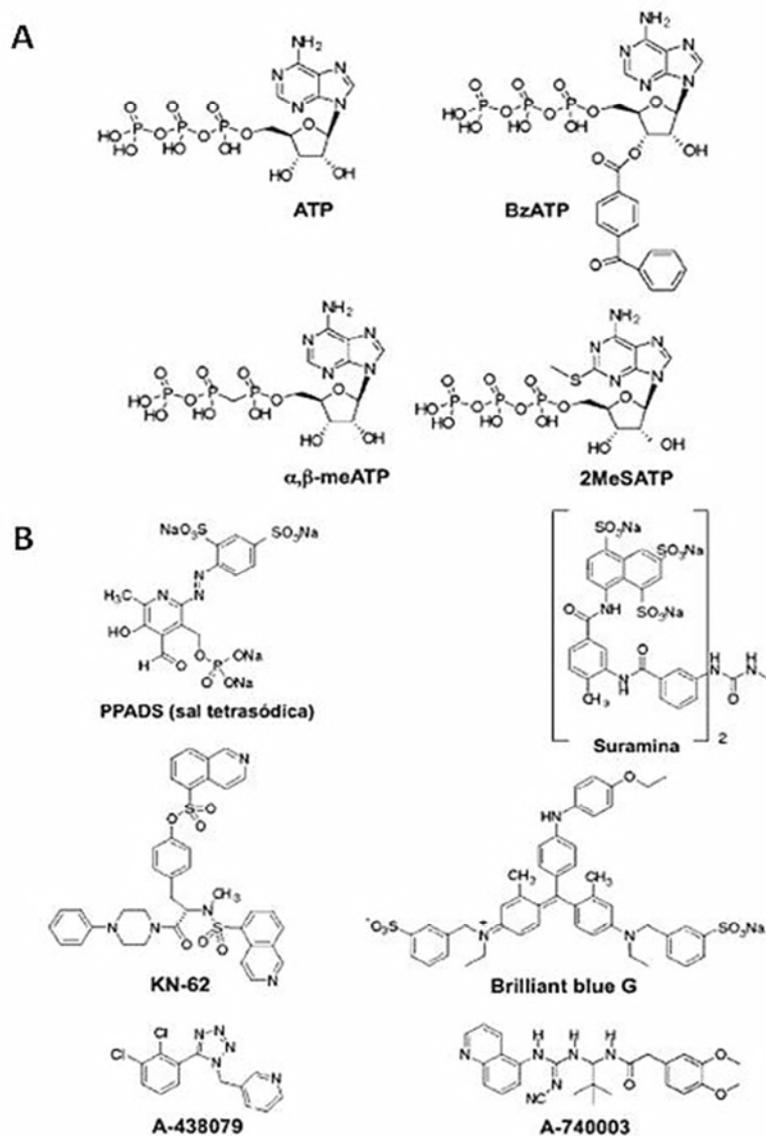


**Figura 17.** Representación esquemática de un receptor P2X. Su conformación se estructura en dos segmentos transmembrana (TM1 y TM2), un gran bucle extracelular y los dominios  $\text{NH}_3^+$  y  $\text{COO}^-$  terminales intracelulares.

#### 3.1.1.1. Agonistas y antagonistas de los receptores P2X

Como agonistas de dichos receptores, encontramos a parte del ATP, el 2MeSATP (buen agonista para todos los P2XR) y el BzATP, que es un buen agonista para los receptores P2X1, P2X5 y P2X7 (Burnstock et al. 2011) (**Figura 18**). Otros ligandos, como el ADP, los nucleótidos de adenina o los nucleótidos de uracilo son generalmente malos agonistas o totalmente ineficaces sobre los canales P2X.

La suramina y el PPADS son antagonistas no selectivos que bloquean la mayoría de los receptores P2X (y como se detallará más adelante, en el caso de la suramina, también muchos de los receptores P2Y). Existen otros compuestos como el TNT-ATP (trinitrofenolderivados) o la diinosina pentafofato que actúan como antagonistas de los receptores P2X, sobretudo sobre los receptores P2X1 y P2X3 (Fountain et al. 2009). Otro antagonista descrito es el Brilliant Blue G, que inhibe los receptores P2X2, 4 y 7. Recientemente, debido a que se ha asociado el receptor P2X7 con procesos de inflamación y dolor, se han intentado desarrollar antagonistas antiinflamatorios y antinociceptivos como el A-740003 y el A-438079. Otros inhibidores como el caso de KN62 son efectivos en la inhibición del receptor P2X7 de ratón y humano pero no el de rata. En la figura tal se recogen los inhibidores más utilizados en la caracterización farmacológica de los receptores P2X.



**Figura 18.** Agonistas (A) y antagonistas (B) más ampliamente descritos para los receptores P2X.

### 3.1.2. Los receptores purinérgicos P2Y

Los receptores de tipo P2Y son receptores metabotrópicos que responden a nucleótidos de purinas y pirimidinas y que pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Abbracchio et al. 2006, Harden et al. 1997).

Su estructura terciaria como puede observarse en la **Figura 19** se basa en 7 dominios transmembrana, con el dominio N terminal en el espacio extracelular y con el dominio C-terminal en el citoplasma.



La familia de receptores P2Y se puede dividir en función de la selectividad por el ligando que es capaz de activarlos. Cada receptor presenta diferentes afinidades a nucleótidos (ATP, ADP, UTP and UDP) (von Kugelgen et al. 2011). Para la mayoría de ellos se han descrito sus ligandos y se ha confirmado su presencia en el sistema nervioso (Lustig et al. 1993, Valera et al. 1994). A pesar de que un solo nucleótido puede activar a más de un tipo de receptor existe cierta selectividad: P2Y1 y P2Y11 son más selectivos para nucleótidos de adenina y entre los restantes, P2Y2, 4 y 6 presentan una afinidad más elevada para los nucleótidos de uracil que de adenina (Nicholas et al. 1996, Lazarowski et al. 1997, Communi et al. 1995) (**Tabla 3**).

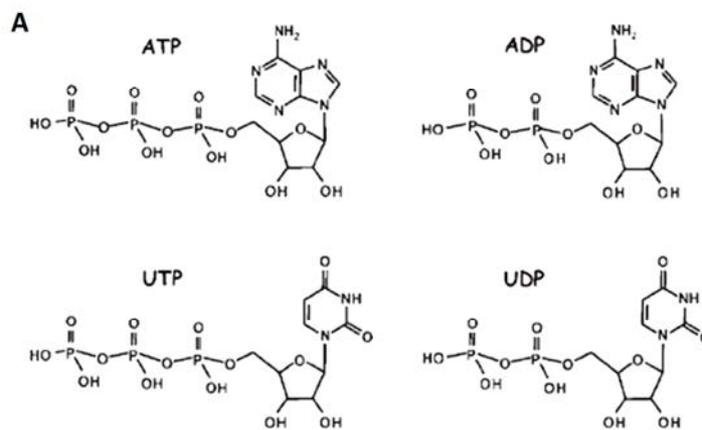
Receptor	Especie	GenBank	Localización cromosómica	Distribución tisular	Agonistas	Antagonistas	Fenotipo de los knockout	Referencias
P2Y <sub>1</sub>	HUMAN	NM_002563.2	3q25.2	Cerebro, corazón, células endoteliales, plaquetas, células Sa, inmunitario, osteoclastos.	MRS 2365> MeSADP> ADP> ATP	MRS 2500> MRS 2279> Suramin> PPADS> PAP	Inhibición de la agregación plaquetaria, incremento del tiempo de sangrado, resistencia a tromboembolismo	Pintor, 1996 Cattaneo, 2004
	RAT	NM_012800.1	2q31					
P2Y <sub>2</sub>	HUMAN	NM_176072.1 NM_176071.1 NM_002564.2	11q13.5	Células del S <sup>o</sup> immune, células epiteliales y endoteliales, riñón, osteoblastos, astrocitos..	UTP > MRS 2698> ATP> INS365> INS37217 >UTPV5> ApA >MRS2768	AR-C 126313> Suramin> RB2	Inhibición de la secreción de cloruro en respuesta a UTP y ATP en las vías aéreas	Ralevic ,1998 Lazarowski ,1995 Yerxa, 2002 Kellerman, 2002
	RAT	NM_017255.1	1q32					
P2Y <sub>4</sub>	HUMAN	NM_002565.3	Xq13	Células endoteliales, placenta, cerebro	2'-azido-dUTP> UTP>ATP (rata)> Ap <sub>4</sub> A> CTP , ITP	ATP (humano)> RB2> Suramin (rata) >PPADS (inhibición contradictoria)	Inhibición de la secreción de cloruro en respuesta a ATP y UTP en las vías digestivas	Lazarowski, 2001 Brunschweiler A, 2006
	RAT	NM_031680.1	Xq31					
P2Y <sub>6</sub>	HUMAN	NM_176798.1	11q13.5	Células epiteliales intestino, placenta, bazo, células T, timo, pulmón, estómago, aorta	MRS 2693/2578 >UDP B 5, PBS 0474> INS 48823, Up3U >UDP >UTP>> ATP	MRS 2578> RB2,PPADS	En progreso	Ralevic ,1998 Communi ,1997
	RAT	NM_057124.2	1q32					
P2Y <sub>11</sub>	HUMAN	NM_002566.1	19p13.2	Bazo, intestino, granulocitos	ATPV5> ARC 67085MX> BzATP <sub>2</sub> ATP UTP?	NF 157 >Suramin> RB2	No existe en murinos	White, 2003 Van der Weyden L, 2000
	RAT							
P2Y <sub>12</sub>	HUMAN	NM_176876.1 NM_022788.3	3q25.1	Plaquetas, células gliales, micro glia	2- MeSADP <sub>2</sub> ,ADP	ARC 69931MX> AZD, INS 50585>RB2> 2- MESAMP	Inhibición de la agregación plaquetaria, incremento del tiempo de sangrado, resistencia a tromboembolismo	Puri RN,1997 Storey RP,2001 Burnstock G,2002
	RAT	NM_022800.1	2q31					
P2Y <sub>13</sub>	HUMAN	NM_023914. NM_176894	3q24	Bazo, cerebro, nodos adiposo, linfáticos, médula ósea	ADP=2- MeSADP> 2-MeSATP ,ATP	ARC 69931> ARC 67085 >MRS 2211>Suramin, RB2	No hay fenotipo descrito	von Kugelgen I,2006
	RAT	NM_001002853.1	2q31					
P2Y <sub>14</sub>	HUMAN	NM_001081455.1	3q21-25	Placenta, tejido adiposo, estómago, intestinos, cerebro	MRS 2690> UDP, UDP- Glucosa> UDP- Galactosa		No hay fenotipo descrito	Abbraccio ,2003
	RAT	NM_133577.1	2q31					

**Tabla 3.** Receptores P2Y. Se muestran los subtipos, las secuencias descritas para rata y humano, la localización cromosómica, distribución tisular, agonistas y antagonistas utilizados, fenotipos de los modelos knockouts generados y referencias sobre ellos.

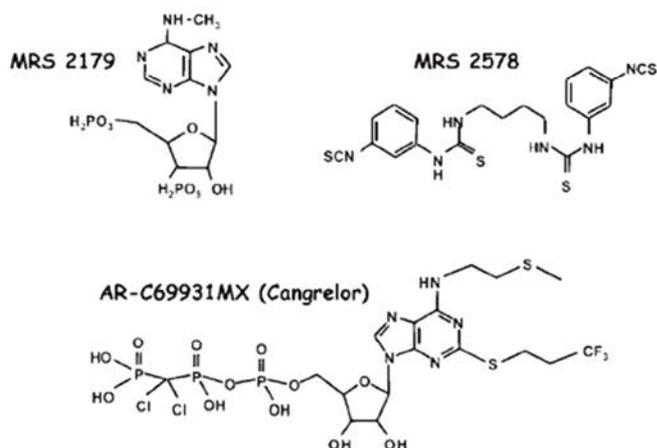
En relación al fenotipo encontrado en los *knockout* generados, los receptores P2Y se han visto implicados mayoritariamente en procesos de agregación plaquetaria, hematopoyesis y respuesta secretora en el epitelio de las vías respiratorias e intestino (**Tabla 3**). Cabe resaltar que existen muchos receptores huérfanos acoplados a proteínas G que presentan homología con receptores P2Y como por ejemplo el receptor humano GPR87 que se ha relacionado con el receptor UDP-glucosa P2Y12 (Joost et al. 2002). La activación de los receptores por diferentes nucleótidos y la habilidad de un solo nucleótido de activar más de un receptor hace difícil determinar la identidad y la funcionalidad de los receptores implicados en una determinada señal.

### 3.1.2.1. Agonistas y antagonistas de los receptores P2Y

Como agonistas de dichos receptores, encontramos el ATP, ADP, UTP y UDP entre otros (**Figura 21A**). El antagonista de receptores P2 más ampliamente utilizado es la suramina. La suramina es capaz de bloquear la mayoría de los receptores P2Y y también puede antagonizar varios receptores ionotrópicos P2X. De antagonistas se han descrito los no selectivos como la suramina y los selectivos, que se han encontrado sólo para algunos de los receptores (**Figura 21B**). En los últimos años se han podido identificar algunos agentes antagonistas selectivos derivados de la adenosina 3',5'-2',5' bifosfato, como el MRS2279 específico para el receptor P2Y1 (Boyer et al. 2002) o los inhibidores MRS2567 y MRS2578 que pueden inhibir el efecto de los agonistas sobre los receptores tanto humano como de rata P2Y6. En contra, el inhibidor MRS2575 es capaz de inhibir el receptor P2Y6 humano pero no el de rata. Metabolitos derivados de fármacos utilizados como anticoagulantes tras el infarto de miocardio como la *clopidina* y el *clopidrogel* pueden actuar como antagonistas selectivos del receptor P2Y12. Actualmente pero no hay antagonistas selectivos para P2Y2, P2Y4, P2Y11, P2Y13 y P2Y14.



B



**Figura 21.** Agonistas (A) y antagonistas (B) más ampliamente descritos para los receptores P2Y.

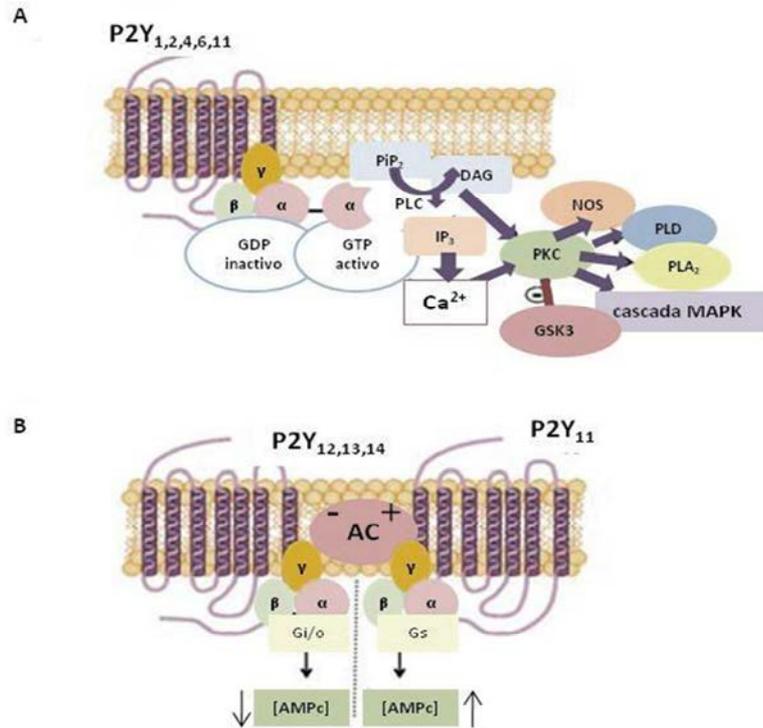
### 3.1.2.2. Vías de señalización a través de receptores P2Y: MAPK

Los receptores P2Y activan diversos mecanismos de señalización intracelular. La mayor parte de receptores de tipo P2Y (1, 2, 4, 6 y 11) están acoplados principalmente a fosfolipasa C o D (PLC, PLD) a través de la proteína Gq/11, y adenilato ciclasa a través de Gi (P2Y2, 4, 12, 13, 14) o a través de Gs (P2Y11) (Morse et al. 2001, Boeynaems et al. 2005) (**Tabla 4**).

Receptor	Proteína G acoplada	Efectores
P2Y <sub>1</sub>	G <sub>q/11</sub>	PLC
P2Y <sub>6</sub>		
P2Y <sub>2</sub>	G <sub>q/G<sub>i</sub></sub>	PLC, AC
P2Y <sub>4</sub>		
P2Y <sub>13</sub>		
P2Y <sub>11</sub>	G <sub>q/G<sub>s</sub></sub>	PLC, AC
P2Y <sub>12</sub>	G <sub>i</sub>	AC
P2Y <sub>14</sub>		

**Tabla 4.** Principales efectores para cada uno de los receptores P2Y. Se muestra la proteína acoplada. En rojo indica inhibición de la proteína. AC: adenilato ciclasa; PLC: fosfolipasa C.

La estimulación de los receptores acoplados a Gq por agonistas induce una liberación de calcio intracelular procedente de los reservorios intracelulares del retículo endoplasmático activando otras vías como la quinasa PKC (Erb et al. 2006) la cual es capaz de activar otras cascadas de señalización secundarias. Una vez el nucleótido interacciona con el receptor, el lípido minoritario de membrana fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) es hidrolizado, dando lugar a la formación de inositol trifosfato (IP3), este metabolito interacciona con los receptores IP3 (IP3R) del retículo endoplasmático e induce la salida de calcio desde los reservorios del retículo (**Figura 22**). Se ha descrito que en células de Schwann el ATP provoca una movilización de calcio intracelular dependiente de receptores P2Y (Green et al. 1997).

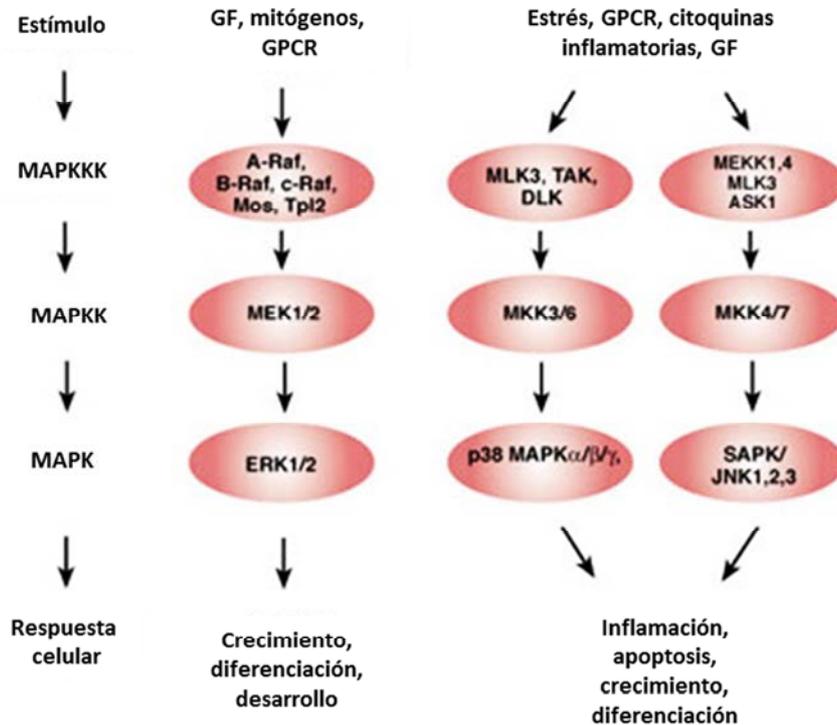


**Figura 22.** Esquema de las vías activadas por la interacción de agonistas con receptores P2Y. En la figura A se muestra la cascada de señalización descrita para los receptores P2Y1, 2, 4, 6 y 11. La interacción del agonista con el receptor provoca que la subunidad  $\alpha$  de la proteína G active la fosfolipasa C (PLC) y esta induzca un aumento de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ) por hidrólisis de inositol bifosfato de membrana ( $PIP_2$ ). El aumento intracelular de  $IP_3$  conlleva a una salida de calcio del retículo endoplasmático que a su vez activa vías secundarias tales como PKC, la cual también es activada por presencia de DAG. Ésta última quinasa prosigue la cascada de señalización activando otras vías como MAPK o NOS. En la imagen B se muestran las vías activadas en receptores P2Y11, 12, 13 y 14. La interacción del agonista conlleva a una activación de la adenilato ciclasa (AC) y a un aumento de la concentración intracelular de AMPc en el caso del receptor P2Y11 y a una inhibición de esta y del AMPc en el caso de los receptores P2Y12, 13 y 14.

Las purinas pueden señalizar a través de la activación de cascadas de MAPK (**Figura 23**) (Tu et al. 2000). La activación de las MAPK a través de receptores P2Y puede ocurrir a través de proteína quinasa como PKC y Scr.

Las MAPK o proteína quinasa activadas por mitógenos son una familia de serina-treonina quinasa que juegan un papel muy importante en la transducción de señales, modulando la transcripción de genes en el núcleo en respuesta a señales extracelulares (Turjanski et al. 2007). La respuesta más común después de la activación de las MAPK es la activación de genes tempranos promoviendo respuestas relacionadas con proliferación y estrés.

## Cascadas de señalización de MAPK



**Figura 23.** Cascadas de señalización de las Mitogenic Activated Protein Kinases (MAPK). Se esquematizan los estímulos, las quinasas "upstream", las quinasas efectoras y los efectos tras su activación. GF: factores de crecimiento; GPCR: receptores acoplados a proteína G.

Después de la activación de estas vías por factores mitogénicos o por estrés, la expresión de factores como c-jun y c-fos se han visto incrementados (Turjanski et al. 2007). Muchos de ellos para tener efectos como factores de transcripción tienen que ser a su vez fosforilados. Así, se ha observado que las MAPK juegan un papel dual en la regulación de los promotores de genes tempranos y en la activación de proteínas nuevas. De entre las diferentes MAPK descritas, tres de ellas han sido implicadas en diferentes procesos de diferenciación y proliferación: la *Extracellular signal Regulated protein Kinase* (ERK 1/2) y dos *Stress Activated-Protein Kinases* (SAPKs): *c-Jun N-terminal Kinase* JNK (JNK 1, 2 y 3) y P38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) quinasa.

La quinasa ERK 1/2 responde normalmente a factores de crecimiento; mientras que las quinasas JNK y P38 responden a diferentes estreses celulares como choques térmicos, inhibidores de la síntesis proteica, choques osmóticos, o radiaciones ultravioleta (Cargnello et al. 2011, Plotnikov et al. 2011). La activación de MAPK se ha visto implicada en respuestas a través de P2X y P2Y en numerosos estudios utilizando astrocitos como modelo celular (Neary et al. 2006), (Panenka et al. 2001). A su vez, muchos de los factores descritos como factores de supervivencia y diferenciación de las células de Schwann (*Neuregulin*, TGF $\beta$ , LPA) se han relacionado con una activación dual de AKT y MAPK, previa activación de receptores acoplados a proteína G (Li et al. 2001).

La activación de las MAPK en presencia de nucleótidos se ha correlacionado sobretodo con aumentos proliferativos. Se ha observado que el ATP es capaz de aumentar la proliferación de fibroblastos y células renales (Huwiler et al. 1994). Posteriormente, en trabajos utilizando modelos de células procedentes de cáncer de mama, el ATP aumenta el calcio intracelular y provoca la fosforilación de las MAPK ERK 1/2, P38 y JNK a través de la activación de los receptores P2Y2 y P2Y4 vía PKC/Src (Scodelaro Bilbao et al. 2010). Estudios recientes a nivel de sistema nervioso, han demostrado que la activación de receptores P2Y y P2X por nucleótidos provoca efectos tróficos en astrocitos, lo cual es importante para el desarrollo y reparación del tejido (Tran et al. 2008a, Neary et al. 2006).

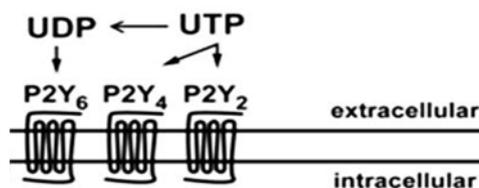
La activación continua de la vía Ras/Raf/ERK además de relacionarse con procesos proliferativos también se ha visto involucrada en procesos de diferenciación (Halfar et al. 2001). A pesar de ello, en células de Schwann se ha observado que la activación de esta vía las conduce a una desdiferenciación celular entrando en un estado quiescente, aún en presencia de un elevado AMPc intracelular o en presencia de axones, sin provocar proliferación ni diferenciación (Harrisingh et al. 2004, Ridley et al. 1988). De forma similar, la señalización mediada por P38 también se ha visto involucrada en procesos de desmielinización, clasificándola como supresora de la mielinización (Haines et al. 2008, Fragoso et al. 2003). Ambos trabajos postulan que después del daño axonal las células de Schwann colindantes se desdiferencian, migran y se vuelven a rediferenciar. Por otro lado, la activación de JNK controla la expresión del factor de transcripción c-jun (en el proceso de desdiferenciación de células de Schwann) (Besirli et al. 2003). Cabe resaltar pues el importante papel de las MAPK en la diferenciación de las células de Schwann.

### **3.1.2.3. Receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uracil: importancia del UTP**

Los primeros indicios que postulaban el UTP como mensajero surgieron cuando se empezaron a describir receptores P2Y sensibles a este nucleótido (Lazarowski et al. 1997, Lazarowski et al. 2001).

La respuesta a UTP equivale a una estimulación de la fosfolipasa C (PLC), a un incremento del inositol trifosfato (IP3), a la movilización intracelular de calcio y a la activación de la proteína quinasa C (PKC). El receptor P2Y2 fue durante mucho tiempo el primer y único receptor descrito sensible a UTP. Posteriormente se describieron dos receptores más sensibles a UTP y UDP: los receptores P2Y4 y 6 (**Figura 24**).

No se ha confirmado la secreción fisiológica de UTP por parte de las células de Schwann pero se ha descrito en otras células gliales que el UTP es secretado conjuntamente con el ATP (Lazarowski et al. 1997, Harden et al. 1999). A nivel fisiológico, el UTP extracelular es capaz de provocar la secreción de cloruro-calcio en células epiteliales y la secreción de catecolaminas en células gliales. Además, la secreción de UTP y ATP (Seminario-Vidal et al. 2009) por parte de las plaquetas en presencia de trombina, provoca respuestas tróficas del epitelio vascular y del músculo liso (Seminario-Vidal, L. 2009}. En células de Schwann, el tratamiento con UTP provoca una secreción de ATP contribuyendo a una mayor comunicación excitatoria entre axones y células de Schwann (Liu et al. 2005).



**Figura 24.** Principales receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina. Adaptado de (Lazarowski et al. 2001).

### 3.1.2.4. Los receptores P2Y en el sistema nervioso

La mayoría de los receptores P2Y se expresan en diversos tipos celulares del SNC, sobretodo en neuronas. En el cerebro humano por ejemplo, existen altas cantidades de mRNA del receptor P2Y1 y P2Y11, P2Y13 y bajas cantidades de los receptores P2Y2, 4 y 6 (Moore et al. 2001, Moore et al. 2000).

No sólo se ha encontrado expresión de dichos receptores en el SNC, ni sólo en neuronas. Receptores como P2Y12 y P2Y14 se expresan mayoritariamente en células gliales mediando respuestas de calcio en astrocitos (Fumagalli et al. 2003). Los axones pueden regular la maduración de los oligodendrocitos y de las células de Schwann mediante el sistema purinérgico, a través de la secreción de ATP (Fields et al. 2002). Estos descubrimientos sugieren que el ATP y a lo mejor otros nucleótidos, que son liberados después de condiciones inflamatorias y muerte celular o en estados fisiológicos normales pueden ejercer como moléculas de comunicación entre diferentes tipos celulares del sistema nervioso.

#### 3.1.2.4.1. Actuación de los nucleótidos como neurotransmisores

En 1959 se describió que los nucleótidos podían actuar como neurotransmisores en el sistema nervioso (HOLTON 1959). Posteriormente en 1972, se confirmó la hipótesis; ya que las estimulaciones eléctricas en el músculo liso provocaban respuestas postsinápticas en presencia de nucleótidos y de antagonistas colinérgicos y adrenérgicos, postulando la existencia de nervios no adrenérgicos no colinérgicos (NANC) (Burnstock 1995).

El primer ligando natural que se encontró para este tipo de receptores fue el ATP. El ATP puede actuar como neurotransmisor en el SNC (Edwards et al. 1992, Nieber et al. 1997, Nieber et al. 1997) (Pankratov et al. 1998, Pankratov et al. 2006), en el SNP (Burnstock 1995) y también en el SNA (Evans et al. 1992, Silinsky et al. 1992). Se ha descrito que el ATP puede mediar respuestas en el epitelio (Schwiebert et al. 2003), las plaquetas (Di Virgilio et al. 2001) y diversas líneas celulares (Raffaghello et al. 2006). Tanto el ATP como otros nucleótidos, colocalizan con neurotransmisores "clásicos" en muchas sinápsis centrales y periféricas (Illes et al. 2004) y se coliberan después del estímulo eléctrico (Phillips et al. 1978); (Wieraszko et al. 1989). Por lo tanto, los nucleótidos pueden tener un papel clave en la neurotransmisión y neuromodulación en diferentes partes del

cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos (Pankratov et al. 2006). Se han hipotizado otras vías de liberación de nucleótidos donde podrían estar implicadas proteínas como la familia ABC (ATP-binding cassette), ectoATPasas (CD39) o hemicanales de conexinas o panexinas (Burnstock 2009b).

La liberación de nucleótidos por parte de las células gliales se ha descrito como una consecuencia de procesos patológicos (como la isquemia o trauma), y se ha asociado la liberación de dichos nucleótidos con la pérdida de la permeabilidad de la membrana bajo condiciones traumáticas. Pero actualmente se sabe que la liberación de nucleótidos por parte de la glía o axones puede darse también en condiciones fisiológicas, sugiriendo que no sólo son partícipes de la reparación si no que pueden tener funciones en estado fisiológicos normales (Abbracchio et al. 2006).

Los nucleótidos pueden mediar efectos a corto plazo y efectos a largo plazo como la diferenciación, el crecimiento de neuritas, supervivencia o muerte celular., relacionándose con diversas patologías, como trauma cerebral e isquemia, enfermedades neurodegenerativas y desordenes psiquiátricos (Abbracchio et al. 2009, Burnstock 2009a).

Por otro lado, la actividad del nucleótidos trifosfato puede ser dual, ya que en condiciones fisiológicas, las ectonucleotidasas externas pueden convertirlos a nucleósidos, y activar otras vías de señalización (Zimmermann et al. 1999).



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

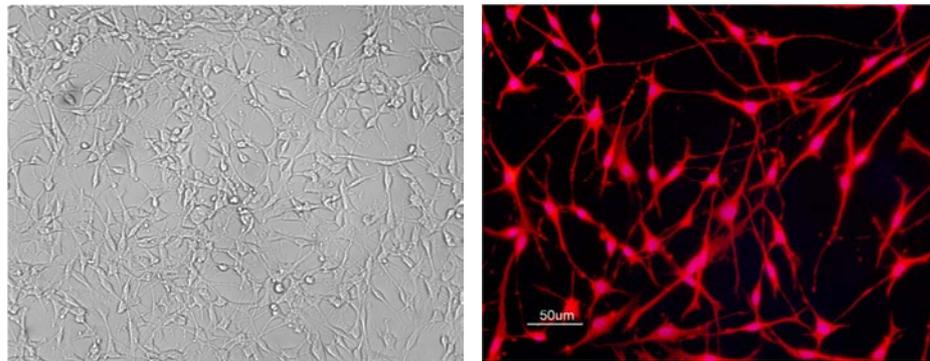


## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. CULTIVOS CELULARES

#### 1.1. Línea celular RT4D6P2T

•Línea celular RT4D6P2T: subclón de células de Schwann de rata establecido de un tumor neuronal inducido por etilnitrosurea (número de referencia en el *European Collection of Cell Culture*: ATTC #93011415, **Figura M1**). Expresa marcadores típicos de células de Schwann como Po y S100. Cultivado en DMEM+10% DBS (V/V).



**Figura M1. Línea celular RT46P2T.** A la izquierda foto en el microscopio invertido de campo claro de la línea celular RT4D6P2T (40X). A la derecha IC contra la proteína S100 en células RT4D6P2T. Observar el fenotipo bipolar y tripolar de las células. Escala: 50 µm.

#### 1.2. Medios y soluciones de cultivos celulares

•Medio de mantenimiento de la línea celular RT4D6P2T: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA) suplementado con 2mM de glutamina, 0.25 g/L penicilina y estreptomicina y 10 % de suero bovino (DBS, Gibco).

•Medio de privación de la línea celular RT4D6P2T: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA) suplementado con 2mM de glutamina, 0.25 g/L penicilina y estreptomicina y 1 % de suero bovino (DBS, Gibco).

•Medio de mantenimiento del cultivo de células de Schwann: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA) suplementado con 2mM de glutamina, 0.25 mg/mL penicilina y estreptomicina, 10 % de suero bovino (DBS, Gibco), 5 µM forskolina y 20 µg/mL de extracto de pituitaria (ambos de Sigma).

•Medio de privación del cultivo de células de Schwann: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA) suplementado con 2mM de glutamina, 0.25 g/L penicilina y estreptomicina, 1 % de suero bovino (DBS, Gibco), 5 µM forskolina y 20 µg/mL de extracto de pituitaria (ambos de Sigma).

- *Medio de digestión*: PBS con 0.5 g/L tripsina, 0.5 g/L DNAsa y 1.7 g/L colagenasa (Sigma).
- *Medio de congelación*: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; PAA) suplementado con 2mM de glutamina, 0.25 g/L penicilina y estreptomycin, 20% de suero bovino (DBS, Gibco) y 10 % de DMSO.
- *Tampón fosfato salino (PBS)* (Sigma): 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.47 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4.
- *Tripsina-EDTA* (Gibco), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

### 1.2.1. Mantenimiento de la línea celular Rt4D6P2T

La línea se creció en medio de cultivo a 37°C con una atmosfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub>. Para sub cultivarla se tripsinizaron con 0.25% tripsina-EDTA (Gibco) y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. La tripsinización se detuvo con la adición de medio, se centrifugaron las células y se sembraron a la densidad requerida.

Para la conservación de las líneas celulares se realizaron congelaciones de las mismas en nitrógeno líquido. Las células se tripsinizaron, contaron y congelaron con medio de congelación. La suspensión celular se transfirió a tubos de congelación y se almacenaron en un contenedor *Cryo freezing* de Nalgene con isopropanol en el congelador de -80°C durante 48 horas. Posteriormente se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido (-196°C).

### 1.2.2. Obtención del cultivo primario de células de Schwann

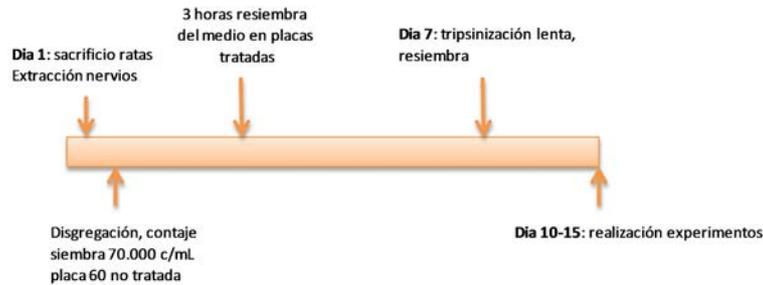
Las células de Schwann pueden ser disociadas de los nervios periféricos y pueden ser purificadas y expandidas en cultivo (Mathon et al. 2001). La obtención de las células de Schwann se realizó tal y como previamente se había descrito con alguna variación en el proceso de eliminación de la población de fibroblastos del cultivo (Johnson et al. 1988).

Se utilizaron crías neonatales de rata *Sprague Dawley* de 3-8 días de edad (P3-P8). Las ratas fueron proporcionadas por el Servicio de Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona y se siguió la normativa ética sobre manipulación de animales de experimentación y otros fines científicos.

Se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los nervios ciáticos de ambas extremidades inferiores bajo la lupa. El tejido conectivo se eliminó para minimizar la contaminación por fibroblastos. Una vez libres de tejido conectivo, se mantuvieron en PBS frío y se seccionaron mecánicamente con un bisturí en trozos de menor tamaño. Posteriormente se procedió a la disgregación mecánico-enzimática. Para ello, los nervios se introdujeron en un tubo con el medio de digestión previamente filtrado y se digirieron a 37°C durante 30 minutos. La digestión de forma mecánica se favoreció cada 10 minutos mediante una pipeta *Pasteur* de vidrio cerrada a la llama y la utilización del vórtex.

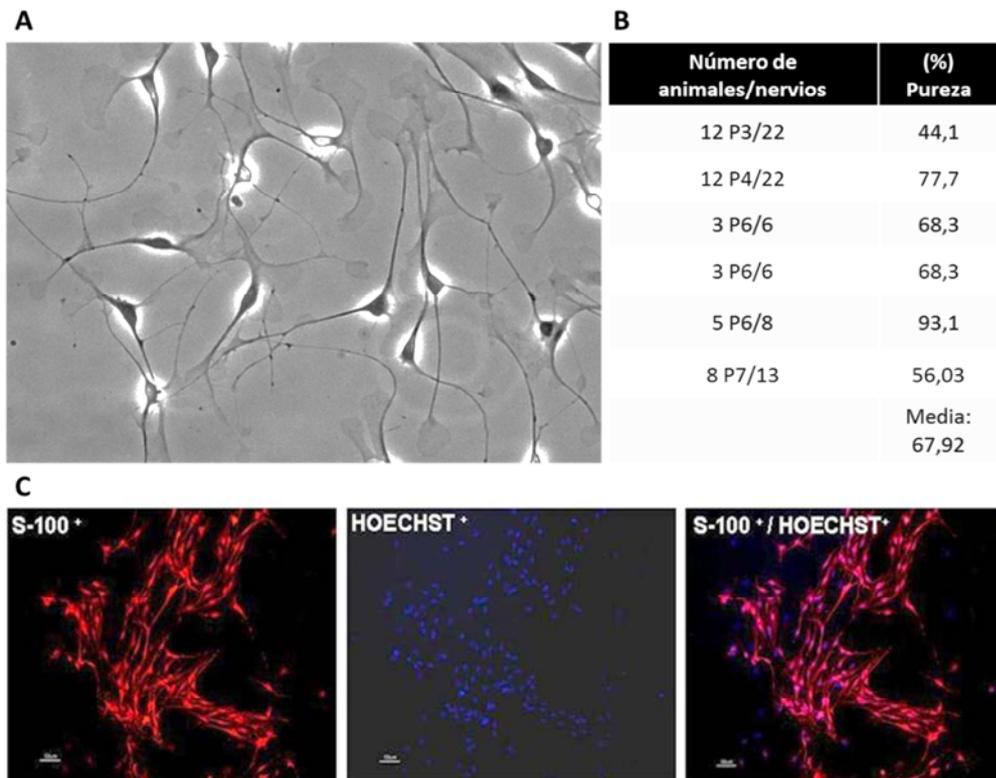
Transcurrida media hora, se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 minutos y se reconstituyó el precipitado con medio de cultivo. Se realizó el conteo mediante la utilización de una cámara de *Neubauer* y se sembraron las células en una placa de 100 mm sin tratar a una densidad de

70.000 células/mL. A las 3 horas, y teniendo en cuenta que los fibroblastos presentan una adhesión mayor que las células de Schwann, se transfería el medio de la placa que contenía células sin adherirse a pocillos de 60 mm tratados con poly-D-lisina (0.05 g/L, Sigma) evitándose así una primera población de fibroblastos. A los 7 días de cultivo se realizó una tripsinización lenta y una resiembra para eliminar la monocapa inferior de fibroblatos. Transcurridos 10-15 días totales se realizaron los diversos experimentos (**Figura M2**).



**Figura M2.** Esquema de la obtención del cultivo primario de células de Schwann.

La pureza del cultivo primario se determinó mediante el conteo de células positivas para el marcador específico S100, en relación al número total de núcleos marcados mediante el colorante Hoechst. Tal y como se indica en la **Figura M3** se obtuvieron purezas de alrededor del 68%.



**Figura M3. Cultivo primario de células de schwann.** (A) Foto de campo claro de células de Schwann. (B) Tabla que muestra los cultivos utilizados para el cálculo de la pureza. (C) Campo representativo utilizado en el conteo de células positivas para el marcador S100<sup>+</sup> en relación al marcador nuclear Hoescht (células totales). P indica la edad (días) de los animales utilizados. Escala: 10  $\mu$ m.

### 1.3. Densidades de siembra y tratamientos de las células

Se muestra en la siguiente tabla las densidades celulares de siembra para cada una de las técnicas realizadas (**Tabla M1**). Los tratamientos se encuentran descritos en los pies de figura detallados en el apartado de resultados.

Técnica	Densidad celular y soporte	Figura
MTT	100.000 c/mL en placas de 24 pocillos	Figura R1
Adhesión intercelular	100.000 c/mL en placas de 6 pocillos	Figura R7
Transfección células/ensayo luciferasa	250.000 c/mL en placas de 24 pocillos	Figura R16
Western blot/IC	50.000 c/mL en placas de 6 pocillos o en platos de 100 mm	Figura R5-12 y Figura R14
Medición de calcio intracelular	50.000 c/mL en placas de 6 pocillos	Figura R3
2DE-DIGE	100.000 c/mL en platos de 100 mm	Figura R4
Extracción de RNA para PCR y qPCR	100.000 c/mL en platos de 100 mm	Figura R2 y Figura R11

**Tabla M1. Densidades celulares utilizadas para cada uno de los métodos experimentales.** Se muestra la densidad celular (c/mL), el tipo de placa y las figuras dónde se muestran resultados utilizando dichas técnicas.

### 1.4. MTT

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT como ha sido descrito previamente (Mosmann 1983). El MTT (bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5, difeniltetrazolio; Sigma) es una sal de tetrazolio hidrosoluble capaz de reducirse a formazán. El ambiente más reductor de las células en proliferación permite reducir mediante las deshidrogenasas mitocondriales el tetrazolium que compone el MTT a un producto de coloración lila (formazán) el cual es soluble en solventes orgánicos. El formazán solubilizado se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda de 595 nm correlacionando la absorbancia con la viabilidad celular.

El MTT se adicionó a una concentración final de 0.5 g/L (el stock se preparó en PBS y se conservó a -20°C protegido de la luz) durante 50 min a 37°C en el incubador. Posteriormente, se aspiró el medio, se sustituyó por el mismo volumen del solvente orgánico DMSO y se cuantificó la coloración a 595 nm en el lector de microplacas Sinergy® (Bio Tek). El valor resultante para cada pocillo se utilizó para expresar el porcentaje de la viabilidad respecto al control no tratado.

### **1.5. Ensayos de adhesión intercelular**

Una vez tratadas, las células se tripsinizaron lentamente utilizando tripsina-EDTA (Gibco) en un agitador orbital a temperatura ambiente. Transcurridos 10 minutos de tripsinización, se contaron las células adheridas en la superficie de la placa utilizando el microscopio invertido mediante la cámara de *Neubauer* y el colorante azul de tripano (en una dilución 1:1, Sigma). Para la visualización de formación de agregados celulares se realizaron fotos después de la tripsinización en el microscopio invertido a 20 y 40 aumentos para cada condición. Se tomaron de 20 a 30 imágenes significativas para cada uno de los controles y tratamientos realizados.

### **1.6. Transfección celular**

La transfección se realizó mediante el reactivo *Lipofectamine™ 2000* de Invitrogen, método que se basa en la formación de liposomas catiónicos de carga neta altamente positiva que interactúan con el esqueleto fosforado de la molécula de DNA. Los complejos DNA-liposomas se obtuvieron adicionando 2 µl de lipofectamina por microgramo de DNA durante 20 minutos a temperatura ambiente. El medio de transfección era OptiMEM (Gibco) sin penicilina ni estreptomycin y suplementado con glutamina (2 mM). Esta mezcla se transfirió a cada pocillo y transcurridas 3 horas se cambió el medio por medio de mantenimiento durante 48 horas previa su lisis.

## 2. MÉTODOS BIOQUÍMICOS

### 2.1. Electroforesis y Western blot

El Western blot (o inmunoblot) fue descrito por Towbin, 1979 (Towbin et al. 1979) y actualmente es una técnica de rutina para el análisis proteico. La especificidad de unión entre el anticuerpo y el antígeno a detectar permite la identificación de una única proteína entre una gran cantidad de proteínas. Los reactivos y tampones que se utilizaron se detallan en la **Tabla M2**.

Reactivos y material de Western blot	
Reactivos y material de electroforesis	
Tampón de electroforesis	25 mM Tris, 0.2 M Glicina, 0,2% (v/v) SDS
Tampón de carga	10mM Tris-HCl, 0.4% (v/v)SDS, 20 mM DTT, 2% (v/v) glicerol, pH=6.8
Acrilamida	30% Acrilamida/Bis solution 37:5:1, Serva
Gel concentrador (3%)	750 µl de la solución acrilamida/bisacrilamida, 6,75 mL de H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> y 2.5 ml de tampón (0,5 M Tris, SDS 0.4%, pH=6.8). Para la polimerización se adicionaron 40 µl de la solución 10% de APS y 10 µl de TEMED (Biorad)
Gel separador (10%)	5 mL de la solución acrilamida/bisacrilamida, 10 mL de H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> y 5 ml de tampón (1,5 M Tris, SDS 0.4%, pH=8.8). Para la polimerización se adicionaron 75 µl de la solución 10% de APS y 25 µl de TEMED (Biorad)
Estándar de pesos	<i>Precision Plus Protein Standards dual color</i> . Pesos de 10KDa-250 KDa (Biorad)
Reactivos y material de transferencia	
Tampón de transferencia	25 mM Tris, 0.2 M Glicina, 10% (v/v) Metanol pH=8.3.
Membrana	<i>PVDF (Polyvinylidene difluoride, Hybond-P, Millipore)</i>
Aparato de transferencia	Mini Protean II (Biorad)
TBS-T	5 mM Tris, 15 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.2% Tween (v/v), pH=7.4
Tampón de bloqueo	5 mM Tris, 15 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.2% Tween (v/v), 5 % leche desnatada en polvo (p/v), pH=7.4

**Tabla M2.** Reactivos y material de Western blot.

### 2.1.1. Lisis celular y determinación proteica

Las células en cultivo se mantuvieron en hielo 10 minutos, se lavaron 2 veces con PBS y se lisaron mediante raspado con tampón RIPA frío [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40, que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasa]. Los lisados se sonicaron tres veces durante 10 segundos. Para poder cargar la misma cantidad de proteína para cada una de las condiciones, la concentración proteica se calculó mediante el método Bradford (Bradford 1976). Este método, se basa en el desplazamiento del máximo de absorción desde 465 a 595 nm que experimenta una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250 al unirse a las proteínas. El procedimiento consiste en la preparación de una recta patrón con concentraciones conocidas de proteína, para después poder comparar las muestras problema con esta recta y así determinar la concentración. La recta patrón se preparó a partir de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1 g/L (Biorad), la cual se disolvió en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> para obtener unas concentraciones de 5, 10, 15, 25, 35 µg/mL

En una microplaca de 96 pocillos se sembraron por triplicado 150 µl de cada punto de la recta patrón, junto con un punto de concentración de 0 g/L. También se depositaron por triplicado 4 µl en una dilución 1/50 de los lisados celulares para entrar en el rango de la recta patrón. Se adicionaron 50 µl del reactivo Bradford a cada pocillo, leyéndose la absorbancia de las muestras a 595 nm utilizando un lector de microplacas tipo Synergy HT (Biotek®) y se analizaron los resultados mediante Excel. Con la lectura y el análisis de los datos se obtuvo la ecuación de la recta patrón, que se utilizó para la determinación de la concentración de las muestras problema a partir de la absorbancia medida.

### 2.1.2. Preparación de las muestras, electroforesis y transferencia

Los lisados proteicos se prepararon con tampón de carga y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Las muestras (30 µg cada una) juntamente con el estándar de pesos se separaron según su peso molecular en geles de acrilamida (*Poly Acrylamide Gel Electrophoresis Sodium Dodecyl Sulphate*, PAGE-SDS) de una densidad del 10 % o del 12% de acrilamida aplicando un voltaje de 100 V todo sumergido con tampón de electroforesis. Los geles de separación se estructuraron en dos fases, la fase concentradora en la parte superior, y la separadora en la parte inferior. El gel separador se preparó a diferentes porcentajes de acrilamida (10 o 12 % de acrilamida) según la proteína a analizar y el concentrador se preparó al 3 % de acrilamida. Para la polimerización de los geles se adicionó solución de APS (persulfato de amonio) y N, N, N', N'-Tertramethylethylenediamine (Temed). Al finalizar la electroforesis, las proteínas se transfirieron con un amperaje constante de 400 mA mediante el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer Cell*® (Biorad) a membranas que previamente habían sido activadas con metanol. Para visualizar la correcta transferencia y la carga de proteína efectuada, las membranas se tiñeron con el reactivo *Ponceau* (Sigma) durante pocos segundos y se lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Previamente a la detección de proteínas, se lavaron dos veces con TBS-T.

### 2.1.3. Detección de proteínas

Se bloquearon las membranas con tampón de bloqueo en agitación suave durante 1 hora. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondientes (**Tabla M3**) diluido en TBS-T con un 5 % (p/v) de BSA para las proteínas fosforiladas y con TBS-T con un 5% (p/v) de leche desnatada en polvo para las no fosforiladas a 4°C durante toda la noche. A continuación se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (HPR) diluidos en tampón de bloqueo (1:2000 o 1:5000) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se visualizaron las proteínas mediante la utilización del reactivo de quimioluminiscencia ECL® de Millipore.

ANTICUERPOS PRIMARIOS					
QUINASAS	Origen	Dilución y aplicación		Figura	Referencia y casa comercial
		WB	IF		
Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Policlonal conejo	1:1000		Figura R10, 11,12,14	#9101 Cell Signaling
Phospho-P38 (Tyr182/Thr180)	Policlonal conejo	1:1000		Figura R10, 11,12,14	Ab4822 Abcam
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	Policlonal conejo	1:1000		Figura R10, 11,12,14	#9251 Cell signaling
Phospho-AKT (Ser473)	Policlonal conejo	1:2000		Figura R10	#9271 Cell signaling
ERK1/2	Policlonal conejo	1:1000		Figura R10,12,14	#9102 Cell signaling
P38	Policlonal conejo	1:1000		Figura R10,12,14	Ab27986 Abcam
JNK	Policlonal conejo	1:1000		Figura R10,12,14	#9252 Cell Signaling
AKT	Policlonal conejo	1:1000		Figura R10	#9272 Cell signaling
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN	Origen	Dilución y aplicación		Figura	Casa comercial
Phospho c-fos (Thr325)	Policlonal conejo	1:500	1:100	Figura R17	Ab27793 Abcam
PROTEÍNAS	Origen	Dilución y aplicación		Figura	Casa comercial
ARP3	Monoclonal ratón	1:1000		Figura R5,6	Ab49671 Abcam
PDI	Monoclonal ratón	1:250		Figura R5,6	Ab2792 Abcam
RabGDI	gallina	1:250		Figura R5,6	GW22125B SIGMA
E cadherina	Monoclonal ratón	1:500		Figura R7	610181 BD
N cadherina	Monoclonal ratón	1:1000	1:250	Figura R7,8,9	610921 BD
NCAM	Monoclonal ratón	1:1000		Figura R7	Sta Cruz SC_71652
VCAM	Monoclonal ratón	1:1000		Figura R7	Sta Cruz SC_53548
S100	Policlonal conejo		1:100	Figura M3	S2644 SIGMA
β tubulina	Monoclonal ratón	1:5000		Figura R7, R8	T5201 SIGMA
GAPDH	Monoclonal ratón	1:20000		Figura R5,6,8,9,10,11,12,14	AM4300 Applied Biosystems

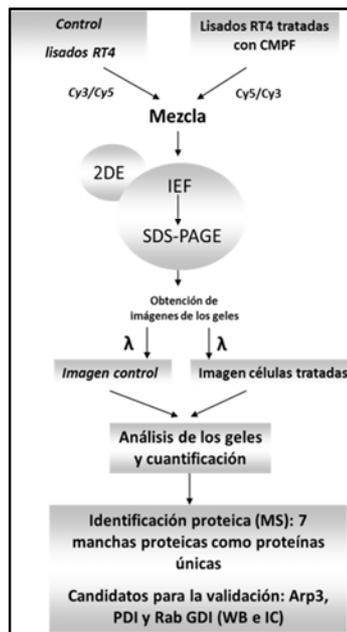
ANTICUERPOS SECUNDARIOS					
CONJUGADOS A HPR	Origen	Dilución y aplicación		Figura	Casa comercial
		WB	IF		
Anti conejo (IgG) HPR	Policlonal cabra	1:5000		Figura R10,11,12,14,17	401315 Calbiochem
Anti ratón (IgG) HPR	Policlonal cabra	1:5000		Figura 5,6,7,8,9,10,11,12,14	401207 Calbiochem
Anti pollo (IgM) HPR	Policlonal conejo	1:2000		Figura R5,6	Ab6753 abcam
CONJUGADOS A FLUOROCROMOS	Origen	Dilución y aplicación		Figura	Casa comercial
Anti ratón Alexa Fluor 488	Policlonal cabra		1:1000	Figura R17	A11006 Invitrogen
Anti conejo Alexa Fluor 488	Policlonal cabra		1:1000	Figura R5,7	A11008 Invitrogen

**Tabla M3. Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados.** Se muestra la especie origen, dilución y aplicación, aparición en figuras y referencia/casa comercial. WB: Western blot; IF: inmunofluorescencia; HPR: peroxidasa.

Para poder realizar la deshibridación de las membranas, se incubaron con una solución de *stripping* (Biorad) durante 20 minutos a 55°C en agitación constante. Transcurrido este tiempo, se lavaron las membranas tres veces con abundante TBS-T para eliminar el β-mercaptoetanol, se bloquearon con solución de bloqueo, se incubaron de nuevo con el anticuerpo primario deseado y se prosiguió a la detección tal y como se ha explicado anteriormente.

## 2.2. 2DE-DIGE

La técnica 2DE descrita en 1975 por O’Farrell y Klose (Klose 1975, O’Farrell 1975) permite separar y analizar mezclas proteicas obtenidas de tejidos, células, plasma u otras muestras biológicas. Las proteínas son separadas según su punto isoeléctrico en una primera dimensión (isoelectroenfoque, IEF) y en una segunda dimensión según su peso molecular (electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE).



**Figura M4. Diseño experimental para el análisis 2DE-DIGE.** IEF: isoelectroenfoque; MS: espectrometría de masas; WB: Western Blot; IC: inmunocitoquímica.

Las proteínas en el gel se hacen visibles o bien por tinciones con plata, Coomassie o tinción negativa con zinc-imidazol, o con tinciones fluorescentes. En las técnicas con marcaje radioactivo o en el DIGE (*Differential in Gel Electrophoresis*) implican el marcaje previo de la muestra a analizar con fluorescencia.

En la técnica DIGE cada muestra es marcada con un fluorocromo diferente, así como también una mezcla de ellas a partes iguales como patrón interno marcado a su vez con un fluorocromo. La comparación de las intensidades de cada uno de los fluorocromos nos permite observar cambios de expresión proteica y compararlos cuantitativamente. En la **Figura M4** se muestra el diseño experimental utilizado.

### 2.2.1. Preparación de la muestra e isoelectroenfoque (IEF)

Se prepararon 3 muestras controles (sin tratar) y 3 muestras tratadas con 1g/L del fármaco CMPF durante 24 horas. Para evitar desviaciones en la intensidad de señal, derivadas de un posible marcaje diferencial de los fluorocromos, se intercalaron las tinciones con Cy3 con Cy5. Como estándar interno se utilizó una mezcla de las muestras analizadas (igual volumen control y tratada) marcada con el fluorocromo Cy2 (**Tabla M4**).

Los precipitados obtenidos de la centrifugación de las células se lisaron en 200 µl de tampón RIPA [150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% ácido deoxicólico, 0.5% SDS, 1mM PMSF, 1% (v/v) DTT, 0.5 g/L DNasa, 50 mM Tris, pH 8]. El extracto se sonicó a 4°C durante 10 minutos, se centrifugó a 20.000xg durante 30 minutos y las proteínas del sobrenadante se precipitaron utilizando el kit *2-D clean up* (GE Healthcare). Los precipitados se resuspendieron en 7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, pH 8. Se cuantificó la concentración proteica del extracto utilizando el kit RC/DR (Biorad) y las muestras se marcaron con los fluorocromos (Amersham Biosciences) en condiciones de mínimo marcaje: 400 pmol de fluorocromo para cada 50 µg de proteína (**Tabla M4**).

Muestras	Control	CMPF 1g/L	Estándar
Gel1	50 µg Cy3	50 µg Cy5	25 µg control+ 25 µg CMPF Cy2
Gel 2	50 µg Cy5	50 µg Cy3	25 µg control+ 25 µg CMPF Cy2
Gel 3	50 µg Cy3	50 µg Cy5	25 µg control+ 25 µg CMPF Cy2

**Tabla M4.** Diseño del marcaje de las muestras con los fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2.

Las muestras marcadas se mezclaron para cargar en el gel un conjunto compuesto por una muestra control, una muestra tratada y un estándar interno (**Tabla M4**). El volumen final se ajustó a 150 µl con una solución que contenía 7M urea, 2 M tiourea, 4 % (p/v) CHAPS, 2 g/L DTT y 2 % (v/v) de anfolitos.

La separación por IEF se realizó con tiras de poliacrilamida de gradiente inmovilizado de 24 cm de rango pI 3-10 (GE Healthcare) en el sistema de IEF IPGhor (GE Healthcare). Previamente se rehidrataron las tiras durante 12 horas con una solución que contenía 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 0.5% (v/v) IPG pH3-10 buffer, 50 mM DTT, 1.2% (v/v) DeStreak (Sigma), y

la muestra se cargó mediante la técnica de *cup-loading*. La evaporación de la muestra y la precipitación de la urea se evitaron con la aplicación de aceite mineral sobre las tiras (IPG cover, GE Healthcare). Las muestras se enfocaron con el siguiente programa: 3 h a 300V, subida hasta 1000V en 6 h y 8000 V en 3 horas, enfoque a 8000V durante 5 horas, llegando a un total de 56000 Vhr.

### 2.2.2. Separación 2-DE y análisis de la imagen

Las tiras se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la segunda dimensión. La separación SDS-PAGE se realizó con el sistema *EttanDalt Six* de Amersham Biosciences. Los geles se polimerizaron al 12.5 % de acrilamida utilizándose vidrios de baja fluorescencia. Previamente a la separación por peso, las tiras fueron equilibradas con 10 ml de tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Urea, 30 % (v/v) glicerol, 2 % (w/v) SDS, 10 g/l DTT y azul de bromofenol, y 15 minutos más con el mismo tampón pero sustituyendo el DTT por 25 g/L de iodoacetamida. Se colocaron las tiras en las partes superiores de los geles y en el lado básico se cargó una tira impregnada con 5  $\mu\text{l}$  de un estándar interno proteico (*Precision Plus Protein standard*, Biorad), el conjunto se selló con agarosa al 0,5 % (p/v). La separación se realizó en dos etapas, una primera de 30 minutos a 2.5 W/gel y una segunda de 5 horas a 12 W/gel a  $18^{\circ}\text{C}$ . Terminada la electroforesis, se escanearon cada uno de los geles para cada uno de los fluorocromos utilizados Cy2, Cy3 y Cy5 mediante un escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare) con longitudes de excitación/emisión de 488/520, 532/580 y 633/670 respectivamente. Una vez escaneados los geles fueron teñidos con el protocolo de tinción en plata de Moertz (Mortz et al. 2001). Las imágenes fueron analizadas mediante el programa *Progenesis Workstation* (Nonlinear Dynamics), para la estadística (ANOVA) se utilizó el mismo programa.

### 2.2.3. Espectrometría de masas e identificación de proteínas

Las manchas proteicas (*spots*) seleccionadas se recortaron manualmente de los geles teñidos con plata y se digirieron con tripsina (Promega) siguiendo las instrucciones pertinentes del robot *Digest MPro* (Invatis). Los trozos de gel fueron lavados con agua milli-Q con 20 mM de bicarbonato de amonio hidrogenado, pH 7.8, reducidos con un 10 mM de DTT, alquilados con 55 mM de iodoacetamida y digeridos con tripsina durante 16 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los péptidos se extrajeron con acetonitrilo (ACN)/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1 v/v) y un 0.1% de TFA. El *fingerprinting* de la masa de los péptidos fue visualizado con un espectrómetro de masas Voyager DE PRO MALDI-TOF (Applied Biosystems) en modo positivo de refracción. Una fracción de 0.5  $\mu\text{l}$  de los péptidos se cargaron en placas de 96 pocillos con una mezcla de 0.5  $\mu\text{l}$  de matriz (3 g/L de ácido ciano-4-hidroxycinnamic en ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1 v/v) y un 0.1 % TFA y se dejaron secar. Como estándar se usó un mix peptídico de des-Arg-1 bradiquina (904.46 g/mol), glu1-fibrinopeptido B(1570.68 g/mol), angiotensin-1 (1296.69 g/mol), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) 1-17 (2093.09 g/mol), ACTH 18-39 (2465.20 g/mol) y ACTH 7-38 (3657.93 g/mol), y cuando fue posible, una calibración interna fue realizada con iones derivados de la autodigestión de la tripsina. El programa *Protein Prospector versión 4.27.2* (UCSF Mass Spectrometry Facility) fue usado para identificar las proteínas con los siguientes parámetros: tolerancia de la masa del péptido, 100 ppm; enzima, tripsina; dos o tres roturas permitidas; modificaciones estáticas, cisteínas carbamidometiladas; modificaciones dinámicas, Glutaminas N terminales modificadas, oxidaciones de metionina y acetilaciones en regiones N terminales. La base de datos *Uniprot* fue usada para la búsqueda.



mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM HEPES, 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$  y 5 mM glucosa, pH7.4) suplementado con un 0.01% (p/v) de BSA (Roche). Posteriormente, las células se lavaron con el mismo tampón para eliminar el Fura-2/AM sobrante y los portaobjetos se montaron en una cámara estática en un microscopio de epifluorescencia invertido Nikon TE2000U. Cuando se pre trataron las células con el inhibidor suramina, se adicionó en ese momento y se incubó durante 20 minutos antes de la adición del UTP o del fármaco CMPF. En el caso de los controles, se mantuvieron los portaobjetos a T° ambiente durante 15 minutos antes de realizar las lecturas. Se escogieron campos de cultivo que fuesen representativos y con morfologías parecidas. Las células se excitaron con una longitud de onda de 340 y 380 nm usando un monocromador (*Cairn Research*) y la luz emitida se detectó a 510 nm cada 4 segundos usando una cámara CCD que se encontraba sincronizada con el *software Metafluor (Universal Imaging)*. La concentración citoplasmática de calcio se representó como la razón de fluorescencia obtenida entre la excitación a 340 nm y la excitación a 380 nm.

#### 3.1. Reacción en cadena de la polimerasa

##### 3.1.1. Extracción de RNA

Se extrajo el RNA mediante la utilización de TRIzol™ (*Total RNA Isolation Reagent*, Invitrogen) de isotiocianato de guanidina, fenol que permite la separación de DNA, RNA y proteína basándose en la formación de diferentes fases (acuosa y orgánica) mediante la reacción con cloroformo. Transcurridos los tratamientos se aspiró el medio y se adicionó el TRIzol™ (1 mL para placas de 60 mm) a cada pocillo, se rasparon las células y el material celular se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL. El material en TRIzol™ se mantuvo a -20°C hasta su utilización. Se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos tubos eppendorf de 1.5 mL. A esta cantidad (unos 500 µl) se adicionaron 200 µl de cloroformo, se mezclaron en el vórtex durante 30 segundos y se mantuvieron a Tª ambiente durante 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, la fase fenólica inferior contenía el DNA y restos de proteínas, mientras que la fase superior contenía el RNA en cloroformo. El sobrenadante se transfirió de nuevo a otro tubo eppendorf y se precipitó el RNA a -20°C toda la noche con 500 µl de isopropanol frío. Al día siguiente, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Los precipitados se lavaron con etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH:H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>, 3:1, v/v) dos veces centrifugándolos a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se secaron a 37°C durante 15 minutos y se re suspendieron con 25 µl de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> libre de RNAsas. Finalmente, se calentaron a 55°C durante 15 minutos y se congelaron a -80°C. La concentración y pureza del RNA obtenido se determinó por espectrofotometría a A<sub>260/280</sub> nm, considerándose niveles de pureza óptimos valores de entre 1.8 hasta 2.1. También se corroboró la concentración y pureza por electroforesis en gel de agarosa-formamida (1%) libre de RNAsas.

##### 3.1.2. Transcripción inversa y amplificación de DNA por PCR

Para realizar la transcripción inversa, se utilizó 1 µg de RNA y se siguieron las indicaciones del kit *Script cDNA Synthesis kit* (Biorad). El cDNA obtenido se conservó a -20°C.

Para la realización de la PCR se utilizaron 250 ng del cDNA obtenido en la retrotranscripción del RNA. Se adicionaron 0.5 µl de la mezcla de desoxiribunucleótidos trifosfatos (dNTP, 10 mM), 2.5 µl del tampón de PCR (10X), 0.75 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1.25 µl de cada uno de los cebadores (100 µM), 0.4 U de Taq polimerasa (Genecraft) llevándolas a un volumen final de 25 µl. La amplificación se llevó a cabo con un termociclador Biorad siguiendo las siguientes condiciones: desnaturalización durante 60 segundos a 95°C, hibridación durante 30 s a 65°C y extensión durante 1 min a 72°C (con un paso final de extensión de 10 min a 72°C). Los productos de PCR (10 µl) se resolvieron en geles de agarosa (1%) con tinción de bromuro de etidio y fueron visualizados en el transiluminador con luz ultravioleta. Los cebadores utilizados para la amplificación de cada gen se detallan en la **Tabla M5**.

Gen diana	Cebadores	Secuencias
N cadherin (NM_031333.1)	Forward Reverse	5'-GCACCAGGTTTGAATGGG3' 5'-CATGTTGGGAGAAGGGGTG-3'
P2Y2 (NM_017255.1)	Forward Reverse	5'-CTGCCAGGCACCCGTGCTCTACTT-3' 5'-CTGAGGTCAAGTGATCGGAAGGAG-3'
P2Y4 (NM_031680.1)	Forward Reverse	5'-CACCGATACCTGGGTATCTGCCAC-3' 5'-CAGACAGCAAAGACAGTCAGCACC-3'
P2Y6 (NM_057124.2)	Forward Reverse	5'-GGAGACCTTGCTGCCGCTGGTA-3' 5'-TACCACGACAGCCATACGGGCCGC-3'
C-jun (NM_021835.3)	Forward Reverse	5'-GCGGCTGAAGTTGGGCGAGT-3' 5'-GGGTTAGCCTGGGCTGTGCG-3'
C-fos (NM_022197.2)	Forward Reverse	5'-GGTCTCTCCGTGGCCCAT-3' 5'-CTTGCAAGCAGGTCGGTGGG-3'
GAPDH (NM_017008.3)	Forward Reverse	5'-TGGGAAGCTGGTCATCAAC-3' 5'-GCATCACCCATTTGATGTT-3'

**Tabla M5.** Listado de cebadores utilizados.

### 3.1.3. Amplificación de DNA por PCR en tiempo real (qPCR)

El análisis cuantitativo de la amplificación de cDNA se midió mediante la incorporación de SYBR Green (*SYBR® Green Kit*, Biorad) en la doble hebra de DNA. Los cebadores usados están listados en la **Tabla M5**. Todas las muestras fueron analizadas respecto la expresión de los genes de mantenimiento GAPDH y  $\beta$  tubulina como controles internos. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización durante 60 segundos a 95°C, hibridación durante 30 s a 65°C y extensión durante 1 min a 72°C (con un paso final de extensión de 10 min a 72°C).

## 3.2. Amplificación y purificación de DNA

### 3.2.1. Obtención de células DH5 $\alpha$ competentes, transformación y crecimiento de las bacterias

*Material:*

- **Medio Luria Broth (LB):** Se disolvieron 25 gr de LB (Invitrogen) en un litro de agua destilada. La solución se esterilizó en la autoclave.
- **Placas de agar:** Se disolvieron 32 gr de agar (Invitrogen) en 500 ml de medio LB y se esterilizó en la autoclave. Cuando se enfrió se adicionó ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se depositó en placas de Petri de 100 mm hasta su solidificación.
- **Medio Inoue:** 55 mM  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 250 mM KCl, 15 mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 10 mM PIPES, pH 6.7

Las bacterias DH5 $\alpha$  se hicieron competentes utilizando el método *Inoue* (*Molecular cloning: A laboratory manual, The condensed Protocols, Protocol 1.24*). Para obtenerlas se crecieron colonias de *E.coli* en LB líquido a 20°C, en agitación y cuando la OD alcanzó 0.55 se depositaron en hielo. Se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se re suspendieron con tampón *Inoue* frío volviéndose a centrifugar. Finalmente, el precipitado se re suspendió con 20 mL de tampón *Inoue* que contenía 1.5 mL de DMSO y se congelaron con nitrógeno líquido. Finalmente se guardaron las alícuotas a -80°C.

Para la transformación de las bacterias, se descongelaron 50  $\mu$ l de bacterias competentes DH5 $\alpha$  en tubos estériles, se mantuvieron en hielo 30 minutos y se adicionó 1  $\mu$ l de DNA. Se incubó la mezcla a 4°C durante 10 minutos y se realizó un choque térmico de 30 segundos a 42°C e inmediatamente se colocaron los tubos en hielo durante 10 minutos. A cada tubo se adicionaron 800  $\mu$ l de medio LB y se incubaron en agitación (200 rpm) durante 30 minutos a 37°C. Parte de la suspensión bacteriana (50  $\mu$ l o 100  $\mu$ l) fue sembrada en placas de agar con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido utilizado, en nuestro caso ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Las placas se incubaron durante toda la noche en estufa a 37°C. Al siguiente día se aislaron colonias, se inocularon y crecieron en 5 mL de medio LB/ampicilina durante 8 horas a 37°C en agitación. Se recogieron 3 mL de cada cultivo y se procedió a efectuar las mini preparaciones de DNA, que nos permitieron saber si el plásmido se había amplificado o no.

### **3.2.2. Purificación de DNA plasmídico (mini preparaciones).**

Los cultivos bacterianos (3 mL) se procesaron tal y como nos indica el kit de purificación de DNA plasmídico de Promega. El DNA eluido de las columnas se re suspendió con agua destilada autoclavada y se midió la concentración de DNA utilizando un espectrofotómetro.

## 4. MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR

### 4.1. Técnicas inmunocitoquímicas

#### 4.1.1. Inmunocitoquímica con fluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica basada como en el caso del WB, en la interacción de un antígeno y de un anticuerpo, y la posterior detección del anticuerpo mediante un fluorocromo conjugado. Esta técnica se realiza directamente sobre las células previamente fijadas para mantener las correspondientes estructuras. Por lo tanto, permite detectar y visualizar proteínas en compartimentos celulares concretos. Las células se sembraron sobre portaobjetos de vidrio pre tratados durante 2 horas a 37°C con 5 µg/mL de poli-L-lisina (Sigma).

Una vez tratadas, las células se lavaron con tampón fosfato atemperado a 37°C y se incubaron con paraformaldehído al 4% (v/v) diluido en tampón fosfato durante 10 minutos a Tª en agitación. Una vez fijadas se lavaron dos veces durante 5 minutos con PBS-BSA 0.5 % (p/v) a Tª. En este paso, las células se podían mantener a 4°C con PBS con un 0.02% de azida sódica durante unos días, antes de la realización de las inmunocitoquímicas. Las muestras ya fijadas, se bloquearon y permeabilizaron con una solución de PBS con Triton 0.2% (v/v), 20 mM de Glicina y BSA 0.05 % (p/v) dos veces durante 20 minutos. Tras la permeabilización las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios oportunos (**Tabla M3**) diluidos en PBS-BSA 0.5% (v/v) durante una o dos horas a Tª, se lavaron dos veces con PBS-BSA 0.5% (v/v) y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a fluorescencia en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente.

Los núcleos se tiñeron mediante la incubación de 1 µg/mL del colorante Hoeschst 33258 o Bisbenzimidida (2-[4-hidroxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil] 2,5-bi-1Hbenzimidazol, Sigma) compuesto fluorecente que se intercala al DNA y emite fluorescencia al excitarlo con luz ultravioleta (Weisblum et al. 1974). Este colorante se adicionó directamente junto con el anticuerpo secundario. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS-BSA 0.5 % (v/v) y se montaron con Mowiol (Sigma) sobre portaobjetos. Las muestras se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su visualización. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia invertido Nikon eclipse 90i con una cámara acopladas Hamamatsu C-4742-80-12AG y el software *Metamorph® Imaging System*.

#### 4.1.2. Inmunocitoquímica con Phalloidina-FITC

Las células se sembraron y fijaron tal y como se describe en el apartado anterior. Una vez permeabilizadas se incubaron con 50 µg/mL de Phalloidina-FITC (Sigma) durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS-BSA 0.5 % (v/v) y se montaron con Mowiol (Sigma) sobre portaobjetos. Los núcleos se tiñeron mediante la incubación de 1 µg/mL del colorante Hoeschst 33258.

## 5. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Todos los experimentos se realizaron como mínimo por triplicado. Los resultados gráficos muestran la media de cada valor  $\pm$  la desviación estándar de la media (SEM).

Los diferentes grupos se analizaron mediante el análisis de la variancia con el test ANOVA con el post-test *Newman Keuls* utilizando el paquete estadístico del programa *GraphPad Prism 3.0* (San Diego, CA, USA). Los valores se consideraron significativamente distintos cuando \* $p \leq 0.05$  y \*\* $p \leq 0.01$ .

## **VIII. RESULTADOS**



**VIII.RESULTADOS****CAPÍTULO I. El UTP induce cambios proteicos y citoesqueléticos a través de la activación de receptores P2Y en células de Schwann**

*Las células de Schwann presentan respuestas en presencia de nucleótidos extracelulares. Éstos podrían tener un papel importante en la regeneración axonal y en la mielinización, y llegar a presentarse como importantes moléculas terapéuticas para el tratamiento de neuropatías periféricas.*

*A pesar de ello, pocos son los estudios a nivel proteico sobre los cambios que provocan los nucleótidos extracelulares en estas células. En este primer capítulo se estudiaron los cambios proteicos de la línea celular de Schwann RT4D6P2T en presencia del fármaco Núcleo CMP Forte (CMPF), el cual está compuesto por los nucleótidos UMP, UDP, UTP y CMP. La expresión de los receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina fueron demostrados mediante RT-PCR y mediante la salida de calcio intracelular desde los reservorios del retículo endoplasmático. Posteriormente, se analizaron cambios proteicos en las células RT4D6P2T tratadas con el fármaco CMPF mediante la técnica 2DE-DIGE. Se observaron 11 proteínas diferenciales sobre reguladas en presencia del fármaco y de todas ellas, sólo se identificaron seis mediante espectrometría de masas. Algunas de las proteínas encontradas estaban estrechamente relacionadas con la reorganización de la actina (Actin-Related Protein, Arp3), el transporte vesicular de membrana (Rab GDP Dissociation Inhibitor  $\beta$ , Rab GDI), y la respuesta de estrés del retículo endoplasmático (Protein Disulfide Isomerase, PDI). La sobre regulación proteica era debida a la presencia en el fármaco del nucleótido UTP y a la activación de receptores P2Y, ya que se observaron los mismos resultados tratando las células con el nucleótido UTP y se revirtieron los efectos con el antagonista de receptores P2, suramina. Debido a que una de las proteínas sobre reguladas era uno de los componentes principales de la nucleación de la actina, se analizó si el tratamiento con CMPF o UTP provocaba un cambio en la estructuración del citoesqueleto mediante tinciones con Phalloidina-FITC. Se observó que tanto el tratamiento con CMPF o UTP provocaba un cambio en la reorganización de forma dependiente a la activación de los receptores P2Y, ya que los efectos fueron inhibidos también en presencia del antagonista suramina.*

*En resumen, los datos presentados demuestran que el nucleótido UTP es capaz de interaccionar con receptores P2Y presentes en las células de Schwann y activar cascadas de señalización intracelulares que inducen cambios en la expresión proteica y en la organización del citoesqueleto de actina.*

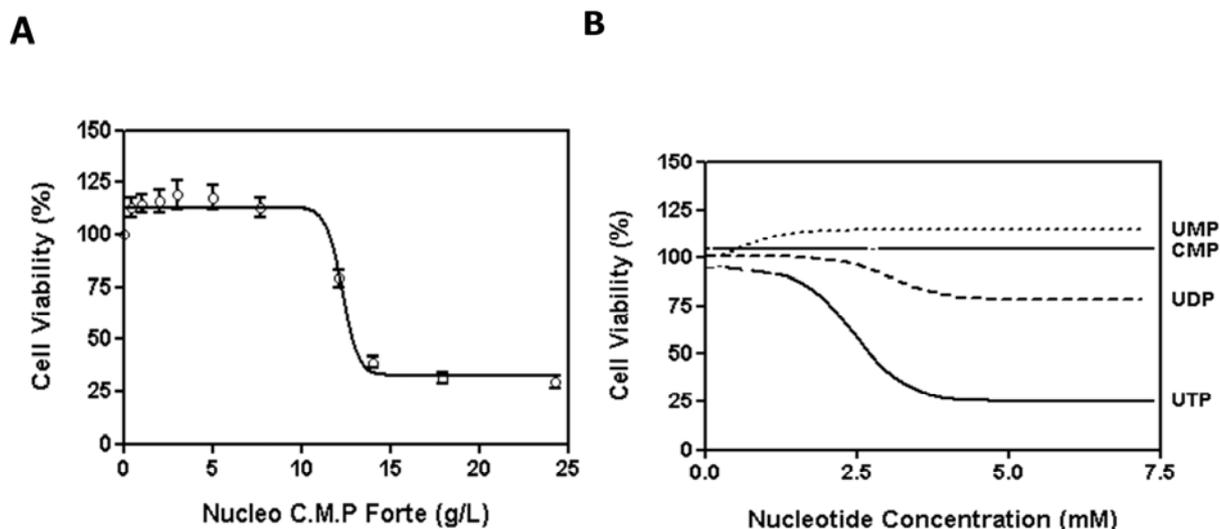
*Los resultados expuestos en este capítulo se corresponden al artículo "**UTP affects the schwannoma cell line proteome through P2Y receptors leading to cytoskeletal reorganization**". Tània Martíáñez, Montserrat Carrascal, Aloa Lamarca, Mònica Segura, Núria Durany, Roser Masgrau, Joaquín Abian, Alejandro Gella." que se encuentra en los anexos.*

## 1. Toxicidad del fármaco Núcleo CMP Forte® en células de Schwann RT4-D6P2T

Para establecer la concentración de fármaco no tóxica adecuada para realizar el análisis 2DE-DIGE y los experimentos de validación proteica, se determinó la toxicidad del fármaco CMPF y de cada uno de los nucleótidos que lo componen (UMP, UDP, UTP y CMP) mediante el ensayo MTT.

La presencia de concentraciones mayores a 10 g/L del fármaco CMPF provocó una disminución de la viabilidad celular, siendo la  $IC_{50}$  de 12.3 g/L (**Figura R1-A**). Respecto a los nucleótidos, tanto el UMP como el CMP aún siendo presentes en elevadas concentraciones (hasta 7.5 mM), no indujeron muerte celular. En cambio, la presencia de UTP provocó una disminución de la viabilidad celular ( $IC_{50}=2.5$  mM) (**Figura R1-B**). Esta concentración era equivalente a la encontrada en 12.3 g/L del fármaco (2.7 mM de UTP), por lo que se concluyó que el UTP era el causante de la toxicidad del fármaco en las células RT4D6P2T.

Se estableció como concentración de estudio 1 g/L de CMPF. Esta concentración equivalía a las siguientes concentraciones de nucleótidos: CMP (1.7 mM), UMP (339  $\mu$ M), UDP (279  $\mu$ M) y UTP (227  $\mu$ M). Tal y como puede observarse en la **Figura R1-B**, ninguna de estas la concentraciones provocaba una disminución de la viabilidad celular, por lo que se escogió una concentración unificada de estudio de 250  $\mu$ M para comparar de forma independiente los efectos de cada uno de los nucleótidos componentes del fármaco CMPF.



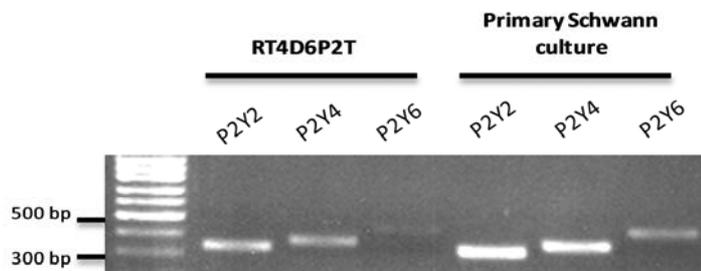
**Figura R1. Cálculo de la viabilidad celular en la línea RT4D6P2T en presencia del fármaco CMP Forte y de los nucleótidos UMP, UDP, UTP y CMP.** (A) Se trataron las células RT4D6P2T con concentraciones crecientes del fármaco CMP Forte durante 24 horas. La viabilidad se determinó mediante MTT y las células sin tratar fueron usadas como grupo control (viabilidad máxima 100 %). (B) La viabilidad de las células de Schwann se midió después del tratamiento con diferentes concentraciones de cada uno de los nucleótidos componentes del fármaco CMP Forte. Las células fueron tratadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de UMP, UDP, UTP, CMP y CMPF y la viabilidad se determinó mediante MTT. Las células sin tratar fueron usadas como el grupo control (viabilidad máxima del 100%). Las dosis respuesta se han representado como una sigmoide y los valores de ambos experimentos muestran la media  $\pm$ SD resultado de cuatro experimentos independientes.

## 2. Expresión de los receptores P2Y en células de Schwann

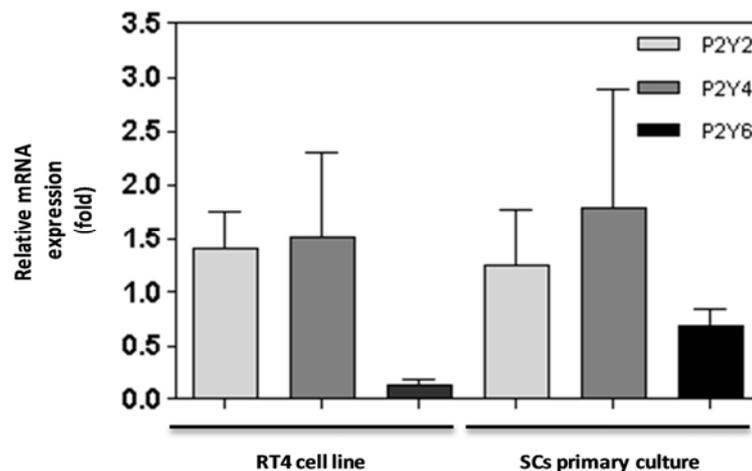
La línea celular de Schwann RT4D6P2T proviene de un neurotumor inducido con etilnitrosurea en rata. Esta línea glial expresa marcadores típicos de células de Schwann como son Po y S100 (Imada et al. 1978, Bansal et al. 1987). A pesar de que se ha demostrado la existencia de receptores P2Y en múltiples células gliales tales como microglía, astrocitos, oligodendroglía e incluso células de Schwann (Berti-Mattera et al. 1996a); (Brautigam et al. 2005); (Potucek et al. 2006), la expresión y funcionalidad de estos receptores en la línea RT4D6P2T no ha sido aún descrita.

El nucleótido UTP, uno de los nucleótidos componentes del fármaco, ha sido descrito como agonista selectivo de algunos subtipos de la familia de receptores metabotrópicos P2Y (Lazarowski et al. 2001). El primer receptor que se describió sensible a UTP fue el P2Y2, seguido del receptor P2Y4 y el receptor P2Y6, el cual es también sensible a UDP. En una primera aproximación, se determinó mediante PCR semicuantitativa y PCR a tiempo real la presencia de los receptores sensibles a nucleótidos de uridina P2Y2, 4 y 6, tanto en la línea celular de rata RT4D6P2T como en cultivo primario de células de Schwann. Tal y como puede observarse en la **Figura R2-A**, se obtuvieron resultados similares en cuanto a la presencia de los tres receptores en ambos modelos celulares, ya que se consiguieron amplificar tres fragmentos de 339, 377 y 450 bp correspondientes a cada uno de los receptores P2Y. En paralelo, se estudió la expresión mediante PCR cuantitativa a tiempo real y se encontró una mayor presencia de los subtipos P2Y2 y P2Y4 respecto el receptor P2Y6 (**Figura R2-B**). De esta forma, se corroboró que la línea inmortalizada RT4D6P2T puede perfilarse como un buen modelo comparativo en cuanto a la expresión (y como se verá en el próximo apartado en la actividad fisiológica) de los receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina en las células de Schwann.

**A**



**B**



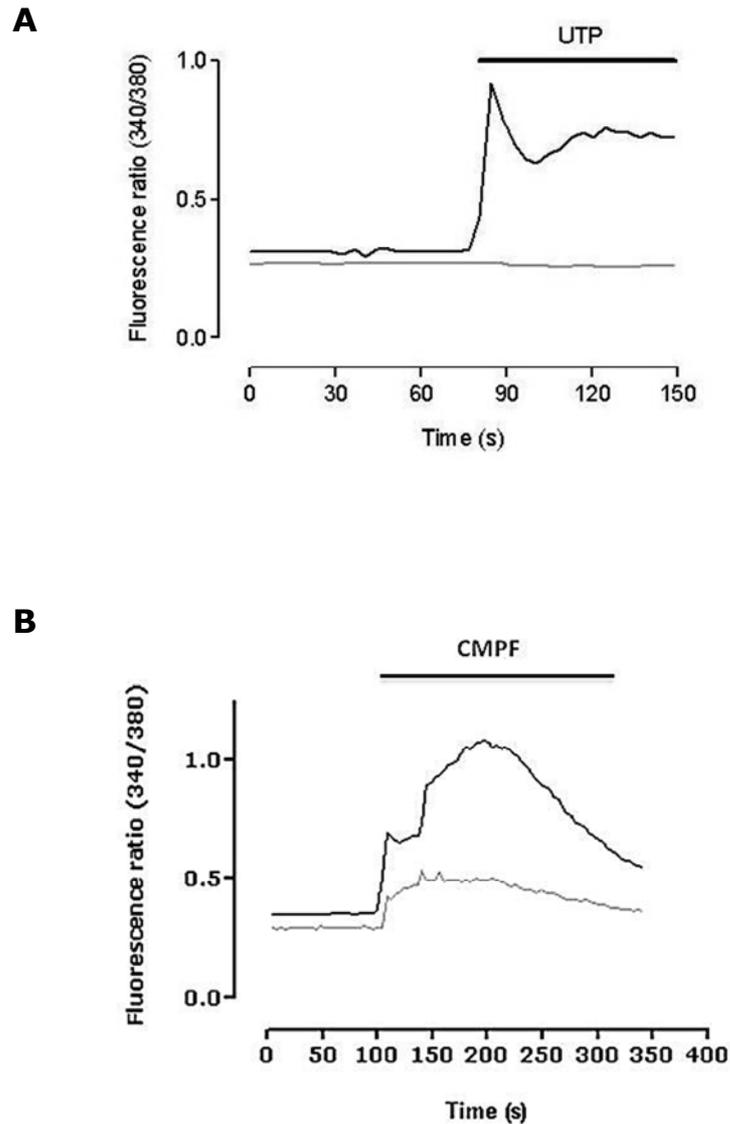
**Figura R2 . Expresión de receptores sensibles a nucleótidos de uridina en células de Schwann. (A)** Amplificación de los receptores P2Y2, P2Y4 y P2Y6 mediante cebadores específicos por PCR. Los productos de PCR se separaron en un gel del 1% de agarosa y se visualizaron mediante la tinción de bromuro de etidio. Se muestra la amplificación de los productos para los receptores P2Y2 (339 bp), P2Y4 (377 bp) y P2Y6 (450 bp) de la línea inmortalizada RT4D6P2T y de células de Schwann procedentes de cultivo primario procedente de ratas neonatales. A la izquierda se muestra el marcador de DNA. **(B)** PCR a tiempo real de los receptores P2Y2, 4 y 6 en células RT4D6P2T y células de Schwann (SCs) procedentes de cultivo primario. Se muestra la expresión relativa respecto los genes GAPDH y  $\beta$  tubulina. Los resultados representan la media  $\pm$ SD de tres experimentos independientes.

### 3. Funcionalidad de los receptores P2Y

La falta de anticuerpos selectivos para los receptores P2Y hace complicado el estudio de esta amplia familia. Debido a ello, los estudios funcionales como la medición intracelular de IP3 o la medición de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Erb et al. 1995; Czubyko et al. 1996) y la determinación de la producción de AMPc en receptores acoplados a adenilato ciclasa se han establecido como los métodos más utilizados en dichos receptores. La funcionalidad de los receptores en nuestro modelo se corroboró mediante la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático a través de la utilización del fluoróforo Fura-2. La razón entre la excitación a 340 nm y a 380 nm se utilizó como medición relativa de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Una vez incubadas con el fluoróforo, las células RT4D6P2T fueron tratadas con 250  $\mu\text{M}$  del nucleótido UTP (agonista de los receptores P2Y2 y 4) y se visualizó la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios del retículo endoplasmático. Como puede observarse en la **Figura R3-A**, después del tratamiento con UTP se observó un pico monofásico característico de los receptores metabotrópicos P2Y seguido de un estado *plateau*. A pesar de ello, la respuesta de las células en presencia del nucleótido fue heterogénea ya que el número de células que respondían variaba desde un 33 % a un 92% (para 6 experimentos independientes). La subida de  $\text{Ca}^{2+}$  en el pico inicial era de  $0.48 \pm 0.02$  unidades. Esta salida fue inhibida en presencia de 100  $\mu\text{M}$  del antagonista no selectivo suramina, el cual inhibió completamente la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, no visualizándose ningún pico al tratar las células con UTP. Sólo en uno de los tres experimentos independientes realizados se visualizó una subida transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  en un 25 % de las células con un pico de  $0.17 \pm 0.04$  unidades.

Resultados similares se encontraron para el fármaco CMPF, ya que la incubación con 1 g/L provocó una salida de  $\text{Ca}^{2+}$  similar a la salida provocada por la presencia de UTP a pesar de que no fue monofásica y la llegada a *plateau* transcurrió con mayor lentitud (**Figura R3-B**). La subida de  $\text{Ca}^{2+}$  en el pico inicial era menor ( $0.22 \pm 0.02$  unidades) que con sólo la presencia de UTP. Posterior al pico inicial había una segunda salida de  $\text{Ca}^{2+}$  que alcanzaba los valores del pico monofásico anteriormente observado en presencia del nucleótido UTP. El retorno a un estado *plateau* transcurría lentamente (300 s), en comparación con el retorno casi inmediato a este estado en el caso del UTP. Sólo en uno de los cuatro experimentos independientes realizados con suramina se visualizó una subida transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  en un 40 % de las células en un pico de  $0.11 \pm 0.05$ . Por lo tanto, el tratamiento con el fármaco CMPF inducía respuestas distintas en cuanto a la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE en comparación con el nucleótido UTP.



**Figura R3. Funcionalidad de los receptores P2Y.** (A) La salida intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se midió después del tratamiento con  $250 \mu\text{M}$  de UTP (línea negra), o después del pre tratamiento con suramina (línea gris) mediante la utilización del fluorocromo Fura-2. (B) La salida intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se midió mediante la utilización del fluorocromo Fura-2 en presencia de  $1 \text{ g/L}$  de CMPF (línea negra), o con pre tratamiento de suramina (línea gris). Las razones de las intensidades entre 340 y 380 nm están representadas respecto el tiempo. Los datos representan la media  $\pm\text{SD}$  de cómo mínimo cuatro experimentos independientes.

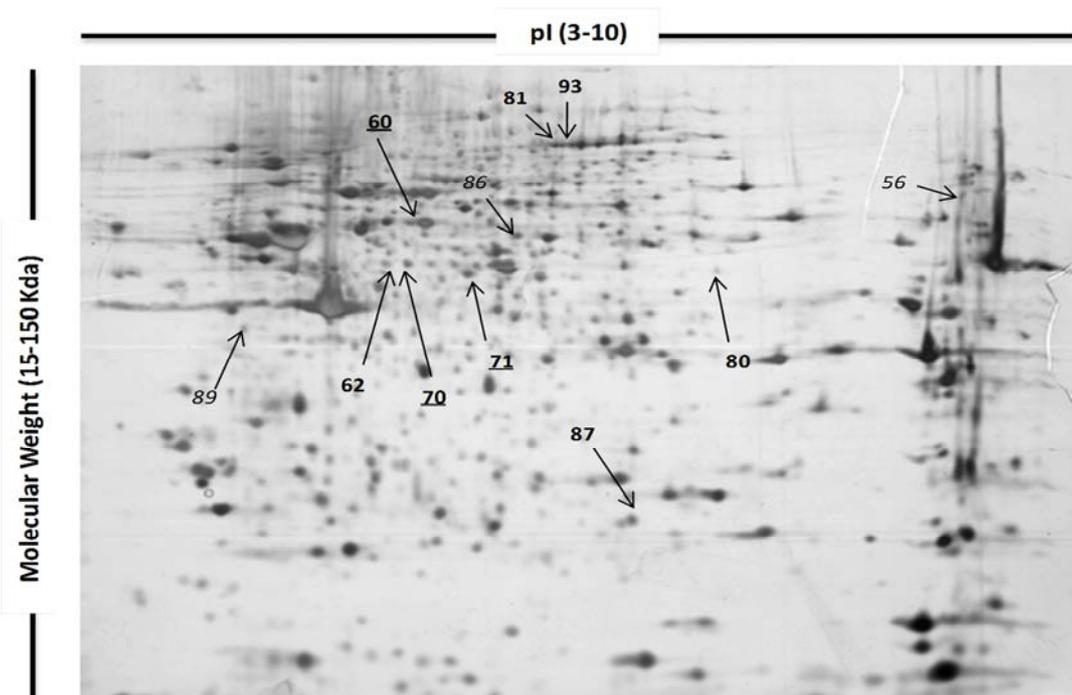
#### 4. Análisis proteico mediante la técnica 2DE-DIGE

Para comparar cambios proteicos en las células RT4D6P2T tras el tratamiento con el fármaco CMPF, se realizó un estudio comparativo proteico 2DE-DIGE.

Se trataron las células RT4D6P2T con  $1 \text{ g/L}$  del fármaco CMPF y se analizaron los lisados mediante un análisis 2DE-DIGE. La primera dimensión de los experimentos 2DE-DIGE se llevó a cabo mediante tiras IPG de pH 3-10. Se consiguieron visualizar un total de 1543 manchas proteicas (spots).

Las imágenes de cada uno de los geles para cada uno de los fluorocromos utilizados se trasladaron al software *Progenesis*. Se normalizaron los volúmenes proteicos con el control interno (mezcla a partes iguales de cada una de las muestras utilizadas) marcado con el fluorocromo Cy2. De todos los *spots*, sólo 11 presentaron cambios entre las muestras control y las muestras tratadas con el fármaco (incremento de al menos  $\geq 1.2$  veces;  $p < 0.05$ ) (**Figura R4**). Estos *spots* se recortaron, se digirieron con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron mediante MALDI-TOF MS.

De los 11 *spots*, sólo se consiguieron identificar 7 mediante espectrometría de masas (**Figura R4**) (los detalles de los parámetros se detallan en el artículo). El *spot* identificado como número 62 contenía más de una proteína por lo que se descartó para el posterior estudio. No se detectó ninguna proteína para tres de los *spots* encontrados (56, 86 y 89). Los *spots* número 81 y 93 resultaron coincidir con la misma proteína (*Elongation Factor 2, EF2*). Esta coincidencia puede ser debida a cambios postraduccionales que se traducen en variaciones del punto isoeléctrico de la proteína. El resto de los *spots* (60, 70, 71, 80 y 87) se identificaron como proteínas únicas: PDI, Arp3, RabGDI, Annexina 11 y TIM respectivamente. Los mayores cambios se obtuvieron con la proteína PDI (1.6 veces de incremento,  $p < 0.05$ ), las proteínas RabGDI, Arp3 y Annexina 11 (1.4 veces de incremento,  $p < 0.05$ ) y por último EF2 y TIM (1.3 veces de incremento,  $p < 0.05$ ).



Spot number	Protein ID	Swiss prot	Functional class	P-value	Fold change	Theoretical MW (Kda)/pI
56	No identification			0.016	1.6	
60	Protein disulfide isomerase A3 (PDI)	P11598.2	Protein folding and calcium homeostasis	0.013	1.6	57/5.8
62	Spliceosome RNA helicase Bat 1/RuvB-like2 (p47 protein)	Q9Z1N5 Q9WTM5	mRNA processing Signal transduction kinase	0.015	1.5	49/5.4 51/5.4
70	Actin-related protein 3 (Arp 3)	Q4V7C7	Cytoskeleton and cell structure	0.043	1.4	47/5.6
71	Rab GDP dissociation inhibitor beta (Rab GDI B)	P50399	Signal transduction	0.007	1.4	50/5.9
80	Annexin 11	P97384	Calcium and phospholipid binding protein	0.019	1.4	54/7.5
81	Elongation factor 2 (EF2)	P05197	Protein translation	0.040	1.3	95/6.4
86	No identification				1.3	
87	Triosephosphate isomerase (TIM)	P48500	Metabolic pathways, energy production		1.3	68/6.8
89	No identification			0.020	1.3	
93	Elongation factor 2 (EF2)	P05197	Protein translation	0.030	1.2	95/6.4

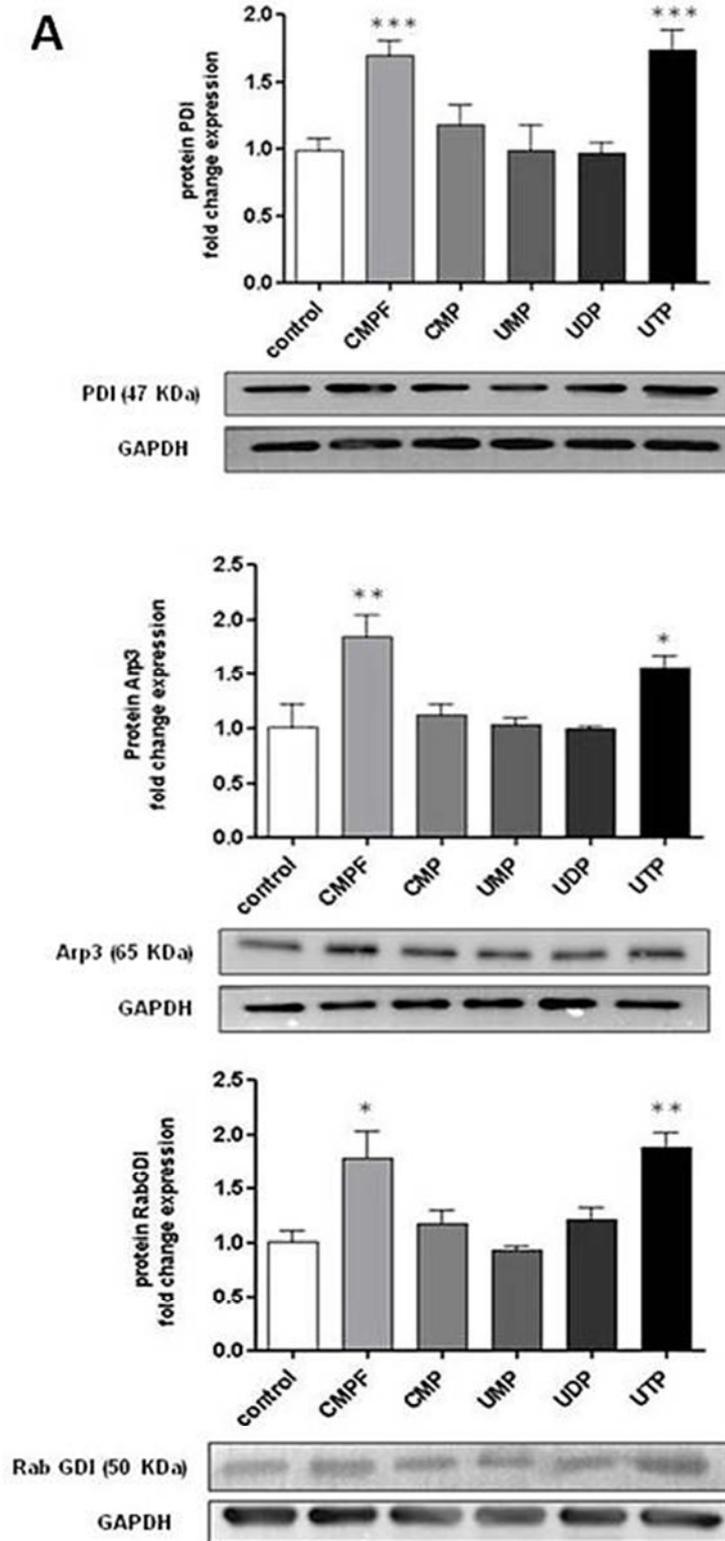
**Figura R4 . Proteínas sobre reguladas en las células RT4D6P2T en presencia de CMPF.** Se analizaron los extractos proteicos (150 µg de proteína marcada con fluorocromos) mediante 2-DE DIGE (con tiras pH 3-10 y geles al 12% de acrilamida). En la imagen superior se muestra un gel teñido con plata. Las flechas indican las proteínas identificadas sobre reguladas y el número que les corresponde en el análisis mediante la utilización del software Progenesis. A la izquierda del gel se muestra el peso molecular y en la parte superior el punto isoeléctrico (pI). En la tabla inferior se muestran los spots correspondientes a las proteínas sobre reguladas con un incremento igual o superior a 1.2 en presencia del fármaco ( $p \leq 0.05$ ). Se indica la proteína identificada, la función y el peso molecular/punto isoeléctrico teóricos. Las proteínas correspondientes a PDI, RabGDI y Arp3 se escogieron para la posterior validación de resultados. Los resultados muestran la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

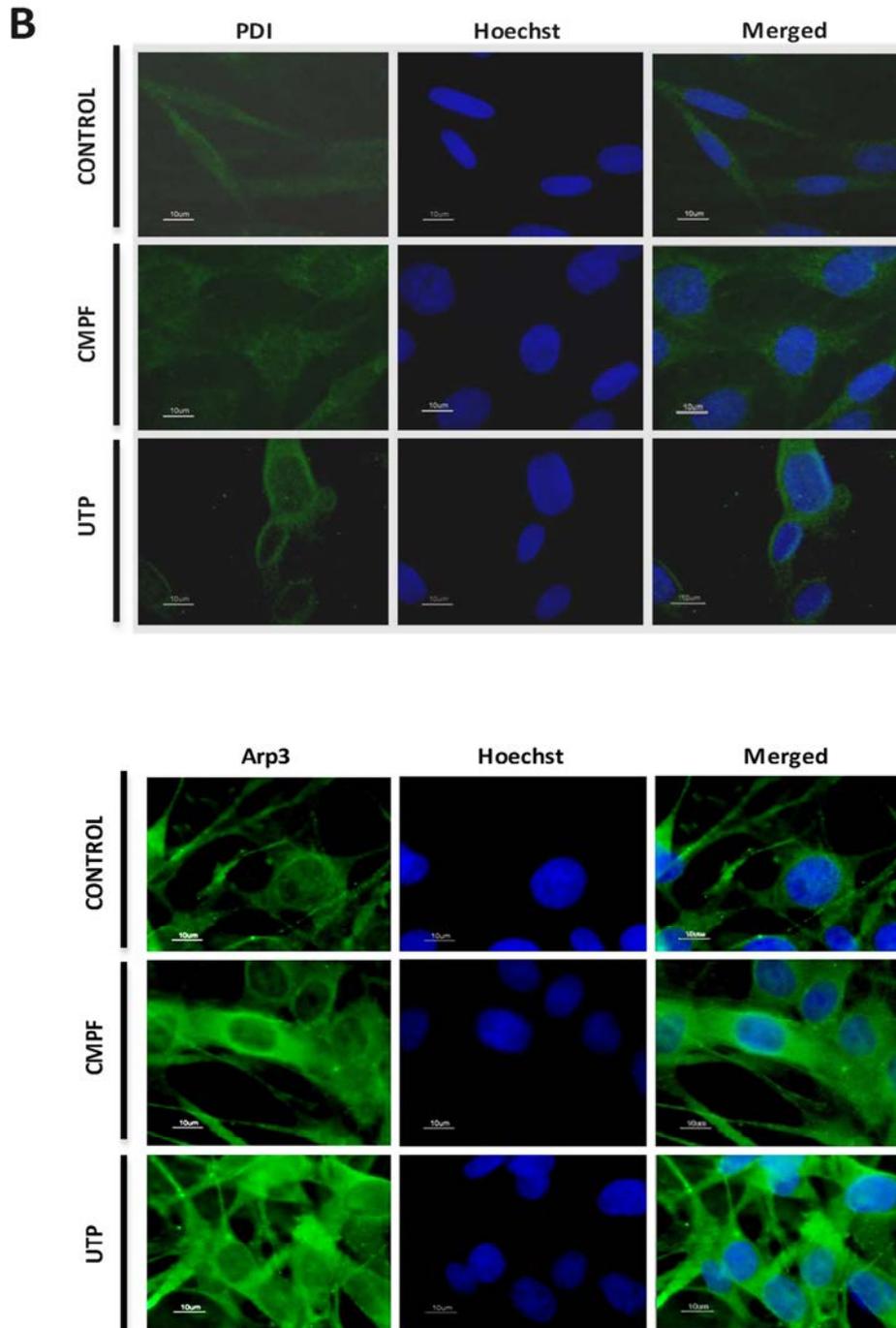
## 5. Validación de los cambios proteicos

Para poder verificar y confirmar los resultados obtenidos mediante el análisis efectuado con la técnica 2DE-DIGE y descartar qué nucleótido estaba mediando los efectos del fármaco CMPF, se escogieron tres de las proteínas encontradas sobre reguladas: PDI, Arp3 y RabGDI, y se validaron los resultados mediante la utilización de dos técnicas de detección proteica de mayor sensibilidad: el Western blot y la inmunocitoquímica.

Las células RT4D6P2T se trataron con 1 g/L de CMPF o con 250 µM de cada uno de los nucleótidos que lo componen y se analizaron los cambios proteicos para cada una de las proteínas escogidas. Como puede observarse en la **Figura R5-A** los aumentos de las tres proteínas fueron similares a los encontrados mediante la técnica 2DE-DIGE. Respecto a la proteína PDI se observó un cambio de 1.9 veces respecto al 1.6 encontrado en el análisis 2DE-DIGE; para Arp3 un cambio de 2 veces respecto a 1.4 y para RabGDI un cambio de 2 respecto a 1.4. Además, mediante la utilización de Western blot se evidenció que el incremento de las tres proteínas era debido exclusivamente a la presencia en el fármaco del nucleótido UTP y no a la presencia de los otros nucleótidos, ya que el tratamiento con este nucleótido provocó cambios parecidos en la sobre expresión de las tres proteínas (**Figura R5-A**). Los resultados fueron doblemente verificados mediante inmunocitoquímica contra las proteínas PDI y Arp3. De esta forma se encontró una mayor señal en el citoplasma de cada una de

ellas en presencia del fármaco CMPF y del nucleótido UTP respecto a las células control. No se encontró ningún anticuerpo eficaz en la detección inmunocitoquímica de la proteína RabGDI por lo que no se pudo verificar la sobre expresión mediante esta técnica (**Figura R5-B**).





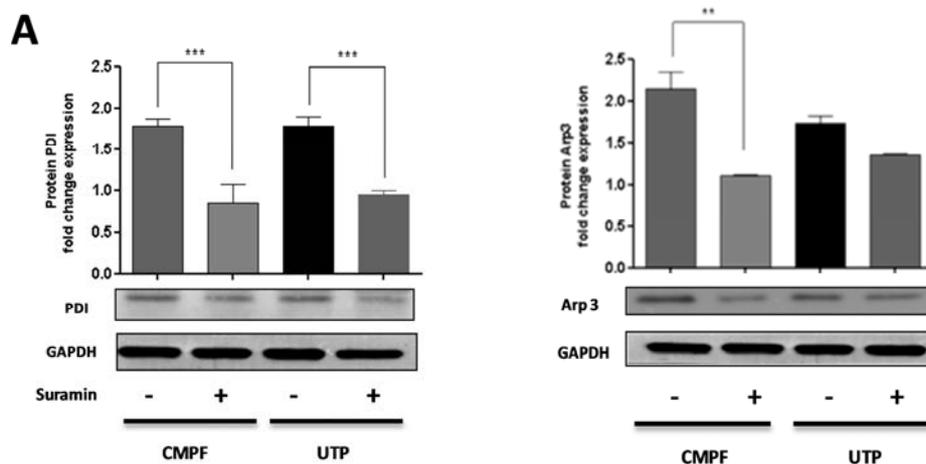
**Figura R5. Validación de los resultados de 2DE-DIGE mediante Western blot e inmunocitoquímica. (A)** Las células RT4D6P2T se trataron con CMPF (1 g/L), CMP (1.7 mM), UMP (250 µM), UDP (250 µM) y UTP (250 µM) durante 24 horas. Los extractos proteicos (30 µg) se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos contra las proteínas PDI, Arp3 y RabGDI. Los cambios en la expresión proteica después del tratamiento con los nucleótidos se expresan como la media  $\pm$ SD de tres experimentos independientes (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , y \*\*\* $p \leq 0.001$ ). **(B)** Las células tratadas con CMPF (1 g/L) y UTP (250 µM) durante 24 horas se fijaron en portaobjetos y se identificaron las proteínas PDI y Arp3 mediante inmunocitoquímica (anticuerpo secundario conjugado a FITC; en verde). Los núcleos se visualizaron utilizando Hoescht 33342 (en azul). Se observó mediante microscopio de fluorescencia un aumento citoplasmático de ambas proteínas después del tratamiento. Escala: 10 µm.

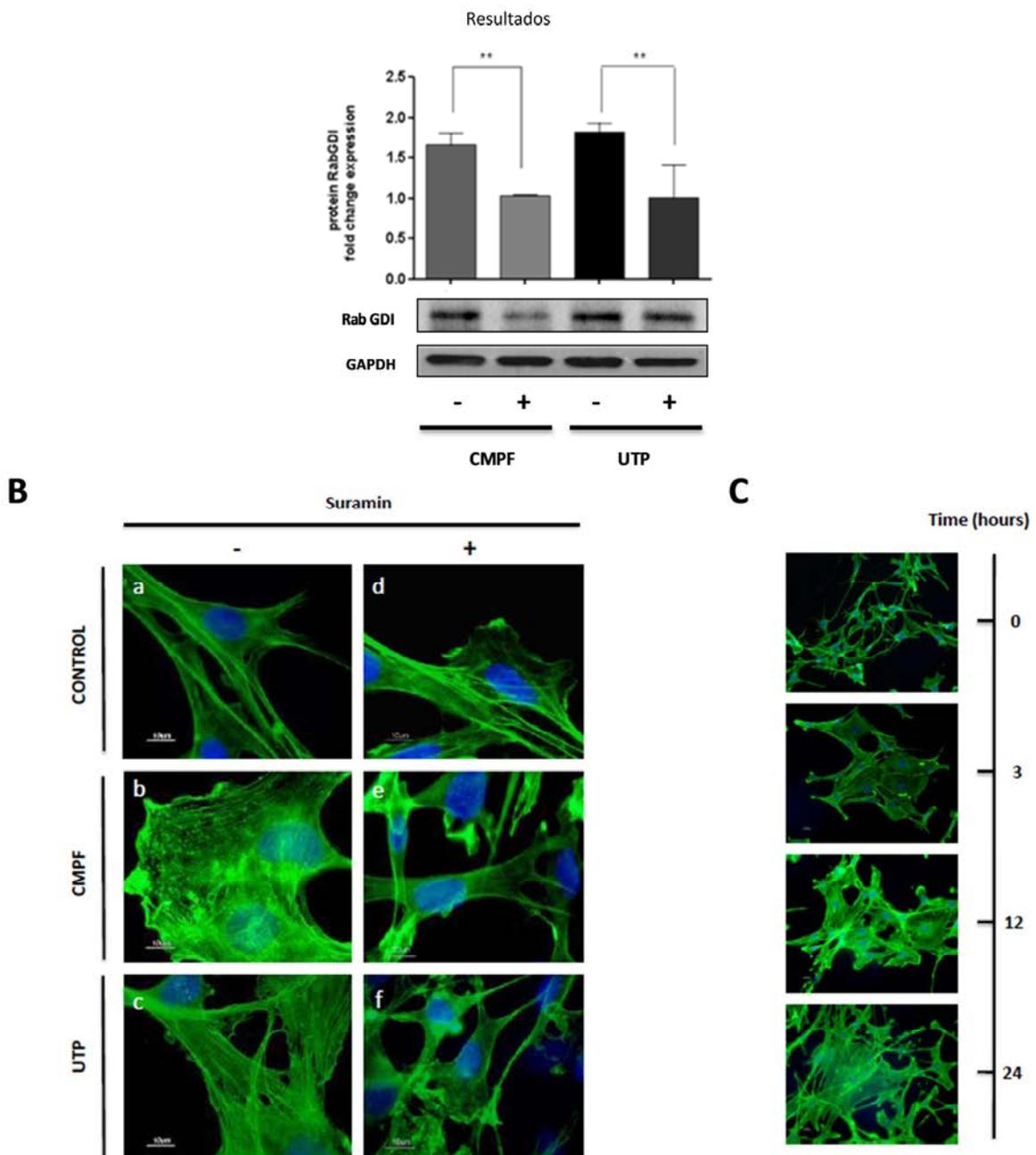
## 6. La sobre regulación proteica y la reorganización del citoesqueleto de actina dependen de la actividad de los receptores P2Y

Debido a que el UTP era el nucleótido causante de los cambios proteicos en la línea celular RT4D6P2T, se estudió si la activación de los receptores P2Y era esencial para la expresión de las proteínas sobre reguladas en presencia del fármaco CMPF o del nucleótido UTP. Se han descrito, para los receptores P2Y, antagonistas selectivos como por ejemplo los compuestos inhibidores del receptor P2Y6, MRS2567 y MRS2578. A pesar de ello, no se han diseñado antagonistas selectivos efectivos para otros receptores como en el caso de P2Y2 y 4. Se ha descrito que la actividad de los receptores P2Y puede ser inhibida con el uso de antagonistas no selectivos de amplio espectro tales como la suramina (Charlton et al. 1996). El uso de este inhibidor nos reveló que la activación de los receptores P2Y estaba implicada en la sobre expresión de tres de las proteínas encontradas en el análisis 2DE-DIGE: PDI, Arp3 y RabGDI. Tal y como se muestra en la **Figura R6-A**, el pre tratamiento de las células RT4D6P2T con 100  $\mu$ M de suramina evitó de forma significativa ( $p \leq 0.01$ ;  $p \leq 0.001$ ) la sobre regulación de las tres proteínas en presencia del fármaco CMPF o del nucleótido UTP. Se obtuvieron resultados similares para cada una de las proteínas estudiadas.

Debido a que una de las proteínas sobre reguladas era Arp3, la cual forma parte del complejo de nucleación de la actina (Martin et al. 2005), se estudió mediante tinciones con Phalloidina-FITC, si el tratamiento con el fármaco CMPF o con el nucleótido UTP era capaz de provocar cambios en la reorganización del citoesqueleto de actina. En las células no tratadas la estructuración de los filamentos de actina se distribuía a lo largo de las extensiones bipolares de las células (**Figura R6-B**). La presencia de 250  $\mu$ M del nucleótido UTP o de 1 g/L del fármaco CMPF durante 12 horas provocó una reestructuración citoplasmática de los filamentos de actina. Además, se incrementó la presencia de conexiones intercelulares y los filamentos de actina formaron un entramado denso distribuido a lo largo de todo el citoplasma parecidos a filamentos de estrés (**Figura R6-B, a-c**). La pre incubación de las células con 100  $\mu$ M del antagonista suramina inhibió la reorganización de actina completamente (**Figura R6-B, d-f**).

Finalmente, se trataron las células con UTP a diferentes tiempos y se observó que la reestructuración causada por la presencia del nucleótido UTP se iniciaba a las 3 horas y se veía aumentada transcurridas 12 y 24 horas de tratamiento (**Figura R6-C**).





**Figura R6. La sobre regulación proteica y la reorganización citoplasmática son debidas a la activación de los receptores P2Y. (A)** La sobre regulación de las proteínas PDI, Arp3 y RabGDI depende de la activación de los receptores P2Y. Se pre trataron las células RT4D6P2T con el antagonista suramina (100  $\mu$ M) durante 30 minutos antes del tratamiento con CMPF (1 g/L) o UTP (250  $\mu$ M) durante 24 horas. Los lisados celulares se analizaron mediante Western blot usando anticuerpos específicos contra PDI, RabGDI y Arp3. Los cambios para cada proteína se expresan como la media  $\pm$ SD de tres experimentos independientes (\*\* $p \leq 0.01$  y \*\*\* $p \leq 0.001$ ). **(B)** La reorganización de los filamentos de actina depende de la activación de los receptores P2Y. Se muestran imágenes representativas de doble marcaje entre la F-actina (Phalloidina-FITC, en verde) y núcleos (Hoechst, en azul). Las células de Schwann se incubaron en ausencia (a, d) o presencia de 1 g/L de CMPF (b, e); o de 250  $\mu$ M de UTP (c, f) durante 12 horas. Las células se pre incubaron con suramina (100  $\mu$ M durante 30 minutos) (d-f). **(C)** Reorganización de la actina a lo largo del tiempo en presencia de UTP. Las células se incubaron con 250  $\mu$ M de UTP a diferentes tiempos. La reorganización de la actina se visualizó mediante la tinción con Phalloidina-FITC (en verde). Los núcleos se tiñeron con Hoeschst 33342 (en azul). Escala: 10  $\mu$ m.

*En presencia de daño axonal, las células de Schwann circundantes pierden marcadores fenotípicos y sintetizan factores tróficos como BDNF y NGF y moléculas de adhesión como NCAM, Mg-CAM, N cadherina y L2/HNK-1 a parte de componentes de la lámina basal como la laminina, tenascina y fibronectina. La expresión de N cadherina suele presentarse en estadios iniciales de diferenciación de las células de Schwann y su expresión se correlaciona con la formación arquitectónica de los nervios. Se ha demostrado que su expresión es de gran importancia en el alineamiento entre las células de Schwann y los axones, y es vital en los primeros contactos entre células y en el inicio del proceso de mielinización. Estudios más recientes han descrito que la presencia de nucleótidos extracelulares en diversos modelos de estudio celulares provoca un aumento en la expresión de algunas proteínas de adhesión.*

*En este segundo capítulo se estudió el efecto del nucleótido UTP en la expresión de diversas moléculas de adhesión en la línea celular RT4D6P2T y en cultivos primarios de células de Schwann. La expresión de N cadherina en ambos modelos incrementó de forma dosis y tiempo dependiente en presencia de UTP. Se produjo un cambio morfológico y una extensión del citoplasma produciéndose una redistribución de la proteína N cadherina. El incremento de la expresión de N cadherina se bloqueó en presencia del antagonista suramina, sugiriendo la participación de los receptores P2. Asimismo, el nucleótido UTP provocó la fosforilación y activación de tres MAPK (ERK1/2, JNK y P38), que a su vez estaban relacionadas con la expresión de N cadherina. Finalmente, se demostró que la activación de las tres MAPK era mediada a través de la vía de señalización Gq (ROCK), fosfolipasa C y PKC. En cuanto a la regulación de su expresión, se observó la importancia de los lugares AP-1 (sitios de unión de los factores de transcripción c-jun y c-fos) en la activación por UTP del promotor de la proteína N cadherina.*

*En resumen, los resultados sugieren que el nucleótido UTP regula la expresión de N cadherina en las células de Schwann a través de la vía de las MAPK. Este aumento de expresión se podría relacionar con un aumento en los contactos entre las células de Schwann y los axones favoreciéndose así la regeneración axonal.*

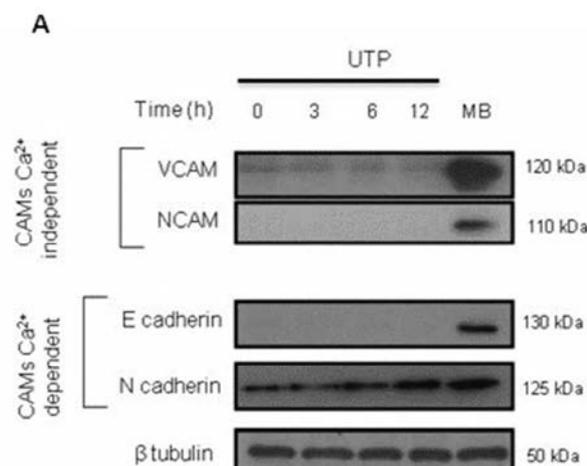
*Los resultados de este capítulo se corresponden al manuscrito "**N cadherin is regulated by extracellular UTP in Schwann cells.** Tània Martíáñez, Aloa Lamarca, Mònica Segura, Núria Durany, Alejandro Gella, Núria Casals" que se encuentra en los anexos.*

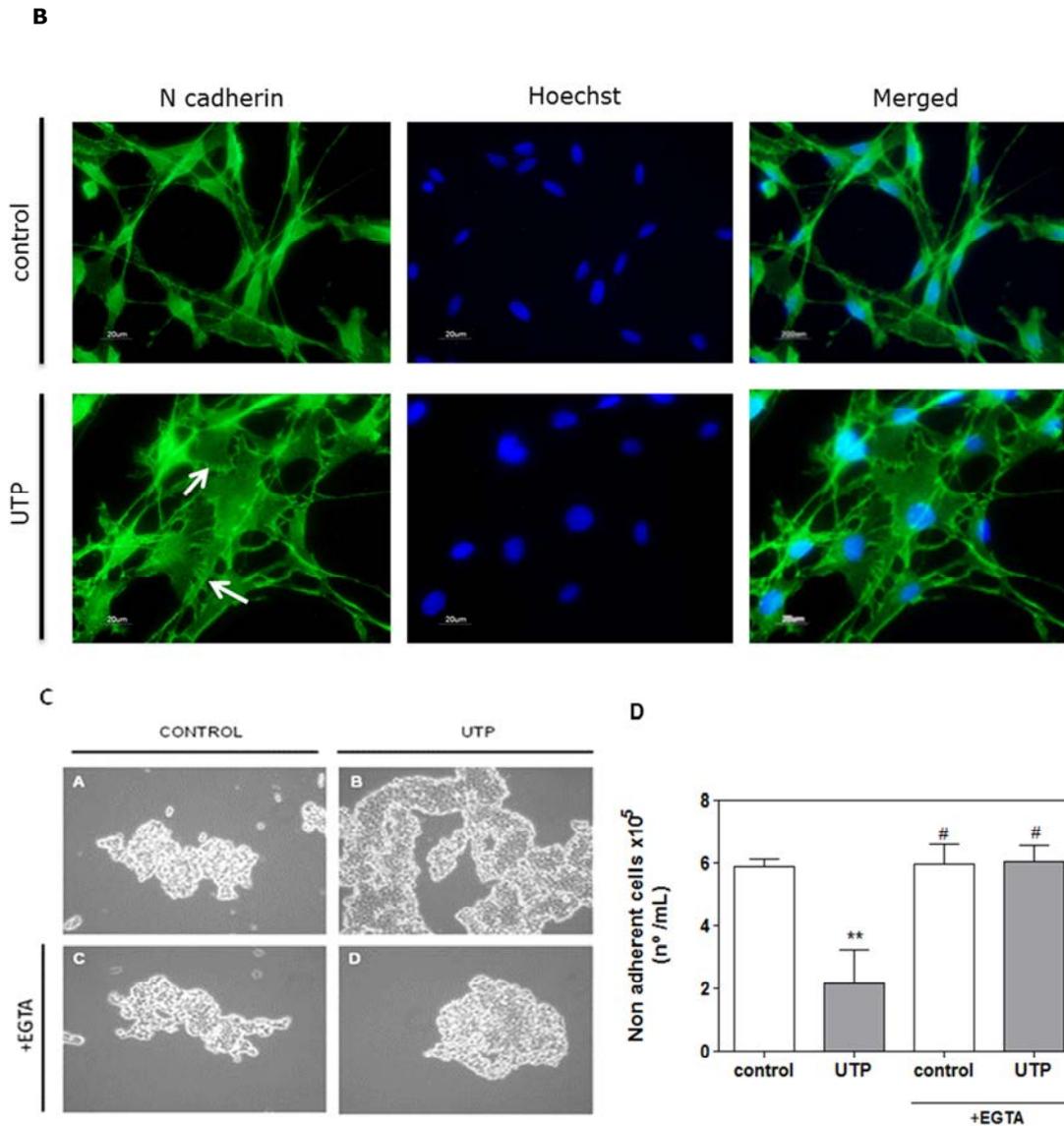
## 1. El tratamiento con UTP extracelular incrementa la expresión de N cadherina y la adhesión intercelular

Actualmente se han descrito aumentos en proteínas de adhesión tales como Thrombospondin-1, VCAM o N cadherina en presencia de nucleótidos extracelulares en células endoteliales y en astrocitos (Neary et al. 2006; Tran et al. 2008a). sin embargo se desconoce la alteración de proteínas de adhesión en presencia de nucleótidos en células de Schwann. El aumento de proteínas de adhesión en presencia de nucleótidos extracelulares podría favorecer los contactos iniciales entre las células de Schwann y los axones para poder acelerar la mielinización y la regeneración axonal.

En una primera aproximación, se determinó mediante Western blot, cambios en la expresión de las siguientes proteínas de adhesión: VCAM, NCAM (ambas  $\text{Ca}^{2+}$ -independientes) y E cadherina, N cadherina (ambas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes) en presencia de 250  $\mu\text{M}$  de UTP extracelular a diferentes tiempos en las células de Schwann. No se encontró ninguna señal para las moléculas NCAM y E cadherina, pero sí se encontró un aumento en la expresión de la proteína N cadherina de forma tiempo dependiente (máxima intensidad a las 12 horas de tratamiento) respecto al control en presencia de UTP (**Figura R7-A**). Paralelamente, se analizó la localización y distribución celular de N cadherina en las células RT4D6P2T mediante inmunocitoquímica. Se observó un cambio morfológico, ya que desaparecieron los fenotipos bipolares y aparecieron células con morfologías estrelladas y redondeadas con el citoplasma extendido que presentaban una redistribución a lo largo de su citoplasma de la proteína N cadherina. Además, apareció una mayor presencia de conexiones intercelulares en presencia de UTP y una mayor inmunoreactividad de N cadherina en estas uniones (**flechas, Figura R7-B**).

La adhesión a través de cadherinas clásicas depende de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y puede inhibirse en presencia de quelantes extracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  como el compuesto EGTA (Tamura et al, 1998). Tal y como se muestra en la **Figura R7-C, b**, se observó un mayor número de células agregadas en presencia de 250  $\mu\text{M}$  de UTP durante 5 horas respecto las células control. El pre tratamiento durante 20 minutos con 1 mM de EGTA evitó la formación de agregaciones en presencia de UTP (**Figura R7-C, d**). Se corroboró este resultado mediante la cuantificación de células adheridas en placa después del tratamiento con o sin presencia del agente quelante EGTA. La presencia de UTP durante 5 horas indujo una disminución de células adheridas en la placa y un aumento de agregados que fueron eliminados por tripsinización ( $p \leq 0.01$ ), esta disminución se revirtió en presencia del quelante EGTA puesto que el número de células adheridas fue similar al control ( $p \leq 0.05$ ) (**Figura R7-D**).



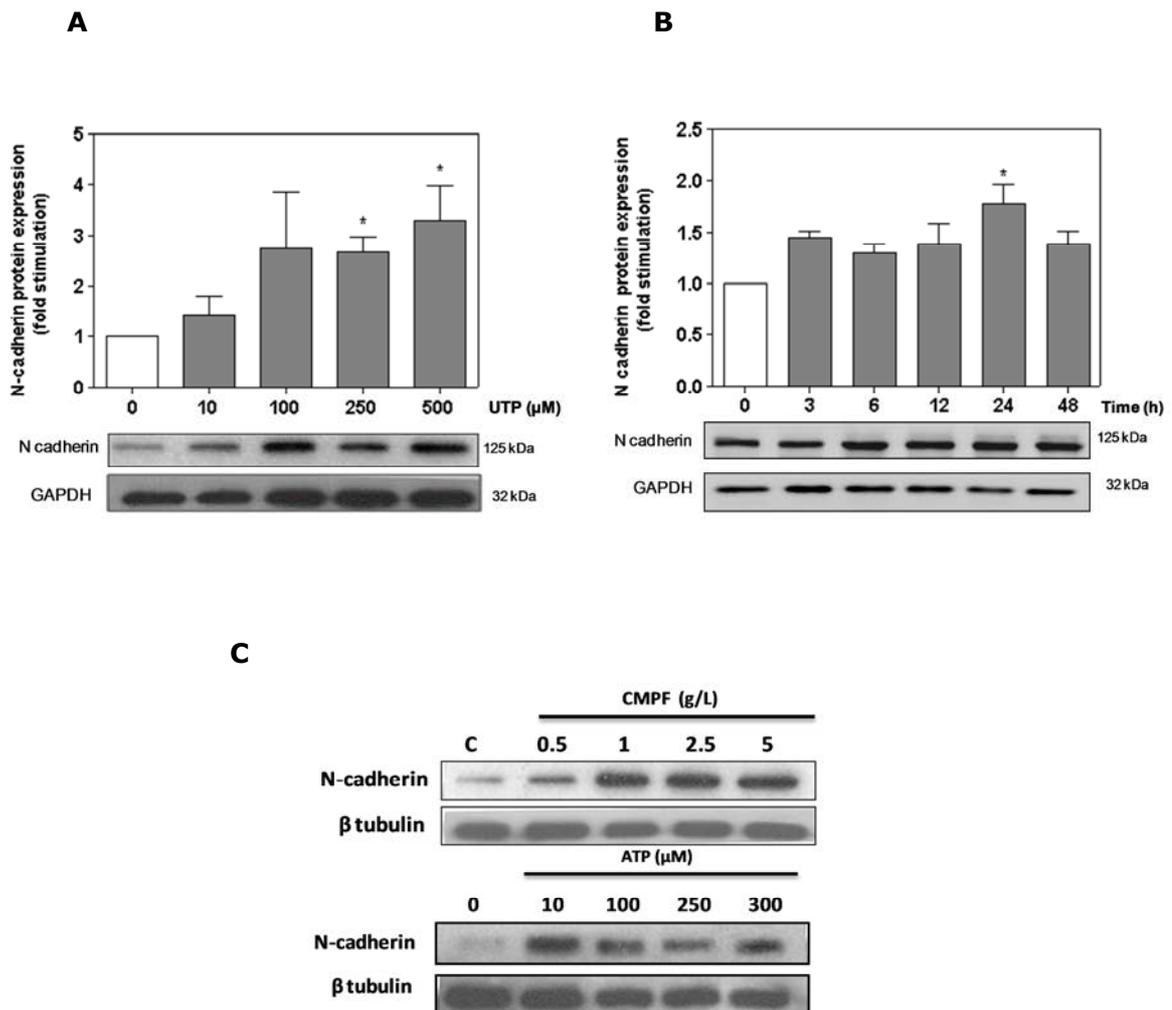


**Figura R7. El UTP extracelular incrementa la expresión de la proteína N cadherina y las uniones intercelulares en células de Schwann. (A)** Las células RT4D6P2T se trataron con 250  $\mu$ M de UTP durante 3, 6 y 12 horas. Los lisados se analizaron mediante Western blot para dos proteínas de adhesión independientes de  $Ca^{2+}$  extracelular (VCAM y NCAM); dos proteínas de adhesión dependientes de  $Ca^{2+}$  extracelular (N cadherina y E cadherina) y el control de carga  $\beta$  tubulina. Se utilizó cerebro de ratón como control positivo (MB). No se observó ninguna señal para NCAM y E cadherina, pero sí una señal muy débil para VCAM. Se visualizó un incremento de la señal de N cadherina a lo largo del tiempo. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. **(B)** Distribución de la N cadherina en presencia de UTP extracelular. Las células RT4D6P2T tratadas durante 12 horas con 250  $\mu$ M de UTP fueron incubadas con anticuerpo anti-N cadherina (verde) y Hoescht (azul). Se observaron cambios morfológicos y un aumento de uniones (flechas) después del tratamiento con UTP (b). Escala: 20  $\mu$ m. **(C)** Visualización de la adhesión bajo microscopio invertido mediante tripsinizaciones lentas. Las células se trataron con 250  $\mu$ M de UTP durante 5 horas con (c, d) o sin la presencia (a, b) de EGTA (1mM, 20 minutos). Se muestra una foto representativa para cada tratamiento. **(D)** Cuantificación de las células no adheridas en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular. Las células no adheridas tratadas con 250  $\mu$ M de UTP en presencia o ausencia de EGTA se contaron después de tripsinizarlas lentamente, mediante tinción con el colorante azul de tripano (1:2) y se representaron respecto su control como la media $\pm$ SD (\*\* $p$  $\leq$ 0.001, # $p$  $\leq$ 0.05).

## 2. El nucleótido UTP aumenta la expresión N cadherina de forma dosis dependiente en las células de Schwann

Las células RT4D6P2T se trataron con concentraciones crecientes de UTP (de 10 a 500  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas o con 250  $\mu\text{M}$  de UTP durante 3, 6, 12 y 24 horas, y la expresión de N cadherina fue cuantificada mediante *Western blot*. Tal y como se observa en la **Figura R8-A**, la expresión de N cadherina aumentó de forma dosis dependiente llegando a la máxima expresión con concentraciones de 250 y 500  $\mu\text{M}$  de UTP (2.8 y 3.9 veces de incremento respectivamente,  $p \leq 0.05$ ). Los incrementos encontrados después del tratamiento con 10 y 100  $\mu\text{M}$  no resultaron ser estadísticamente significativos. De igual forma se encontró a las 24 horas un aumento significativo en la expresión de N cadherina (1.9 veces,  $p \leq 0.05$ ) en presencia de UTP respecto al control (**Figura R8-B**). Los ligeros aumentos encontrados a las diversas horas estudiadas no resultaron ser significativos. Así, se estableció como concentración de trabajo 250  $\mu\text{M}$  de UTP y como tiempo de tratamiento 24 horas.

En paralelo, se trataron células RT4D6P2T con diversas concentraciones del fármaco CMPF (de 0.5 a 5 g/L) o del nucleótido ATP (de 10 a 300  $\mu\text{M}$ ), observándose también un incremento significativo en la expresión de N cadherina a partir de 0.5 g/L de CMPF, o en el caso del nucleótido ATP a partir de 10  $\mu\text{M}$  (**Figura R8-C**).



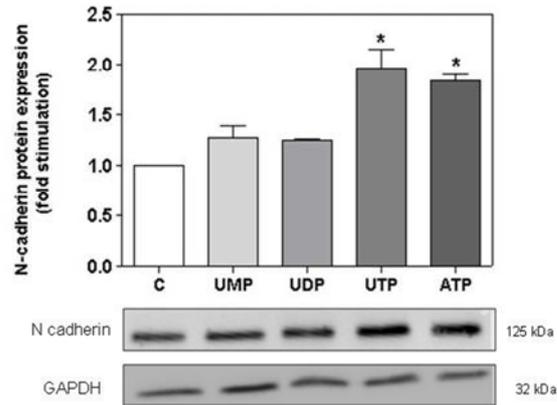
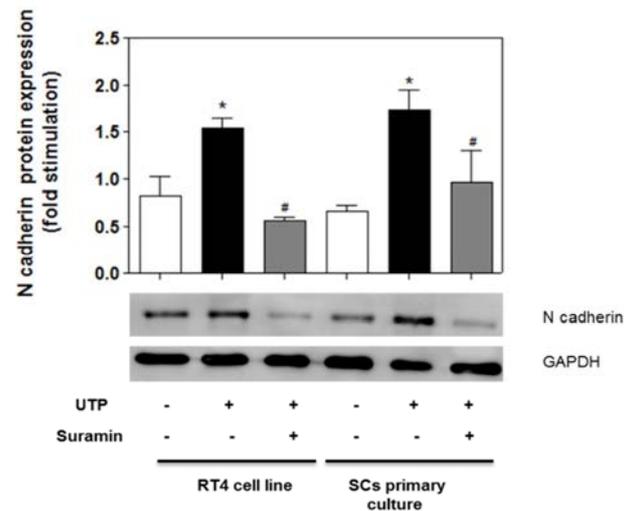
**Figura R8. El UTP extracelular incrementa la expresión de la proteína N cadherina de forma dosis dependiente. (A)** El UTP incrementa la expresión de N cadherina de forma dosis-dependiente. Las células RT4D6P2T se trataron con concentraciones crecientes de UTP y se visualizó mediante Western blot la expresión de la proteína N cadherina y de GAPDH. **(B)** Las células RT4D6P2T se trataron con 250  $\mu$ M de UTP durante diferentes tiempos. La expresión de N cadherina y de GAPDH se visualizó mediante Western-blot. Ambos experimentos muestran la media  $\pm$ SD de tres experimentos independientes ( $^*p \leq 0.05$ ). **(C)** El fármaco CMPF y el nucleótido ATP incrementan la expresión de la proteína de adhesión N cadherina. Las células RT4D6P2T se trataron con concentraciones crecientes del fármaco CMPF o del nucleótido ATP y los lisados fueron analizados mediante Western blot con anticuerpos contra la proteína N cadherina y  $\beta$  tubulina. Se muestran inmunoblots representativos de tres experimentos independientes.

### 3. Los receptores purinérgicos P2 regulan la sobre expresión de N cadherina por UTP

El UTP extracelular es capaz de interactuar con las células a través de los receptores purinérgicos P2Y. El agonista ATP provoca la activación de varios receptores y además la pérdida de grupos fosfato por la actuación de ectonucleotidasas externas conduce a la activación de más receptores sensibles a adenosina (de tipo P1) y a ADP. En cambio, el efecto del nucleótido UTP se debe en mayor parte a la activación de receptores purinérgicos de tipo P2Y2 y P2Y4. Es sabido además que las ectonucleotidasas externas metabolizan menos el nucleótido UTP que al ATP, por lo que la desfosforilación al agonista del receptor P2Y6, UDP es un proceso poco frecuente (Lazarowski et al. 2001).

Para determinar si la presencia de otros nucleótidos compuestos por uridina como el UMP o el UDP podían aumentar la expresión de N cadherina se trataron las células RT4D6P2T con 250  $\mu$ M de UMP, 250  $\mu$ M de UDP o 250  $\mu$ M de UTP durante 24 horas y los lisados fueron analizados mediante Western blot. Se utilizó el nucleótido trifosfato ATP (250  $\mu$ M) como control positivo ya que en otras líneas gliales se ha descrito que actúa como agonista de receptores P2 y provoca la sobre expresión de la proteína de adhesión N cadherina (Neary et al. 2006). Además, en los resultados expuestos en el apartado 2 de este capítulo ya se observó un incremento en la expresión de N cadherina en células de Schwann en presencia de ATP a bajas concentraciones (**Figura R8-C**). Como podemos observar en la **Figura R9-A**, los nucleótidos monofosfato y difosfato no provocaron aumento significativo en la expresión de N cadherina. En contra, el tratamiento con UTP o ATP aumentaron la expresión de forma significativa de N cadherina (aumentos de 2.2 y 1.8 respectivamente,  $p \leq 0.05$ ) transcurridas 24 horas.

Para determinar si el aumento en la expresión de N cadherina en presencia de UTP extracelular era debido a la activación de receptores P2Y, se pre trataron las células RT4D6P2T con 100  $\mu$ M de suramina (antagonista de receptores P2) durante 30 minutos y posteriormente se trataron con 250  $\mu$ M de UTP durante 24 horas. El pre tratamiento con el antagonista causó una inhibición en la expresión de la proteína N cadherina en presencia de UTP tanto en las células RT4D6P2T como en el cultivo primario de células de Schwann procedente de ratas neonatales, tal y como se muestra en la densitometría de la **Figura R9-B** ( $p \leq 0.05$ ).

**A****B**

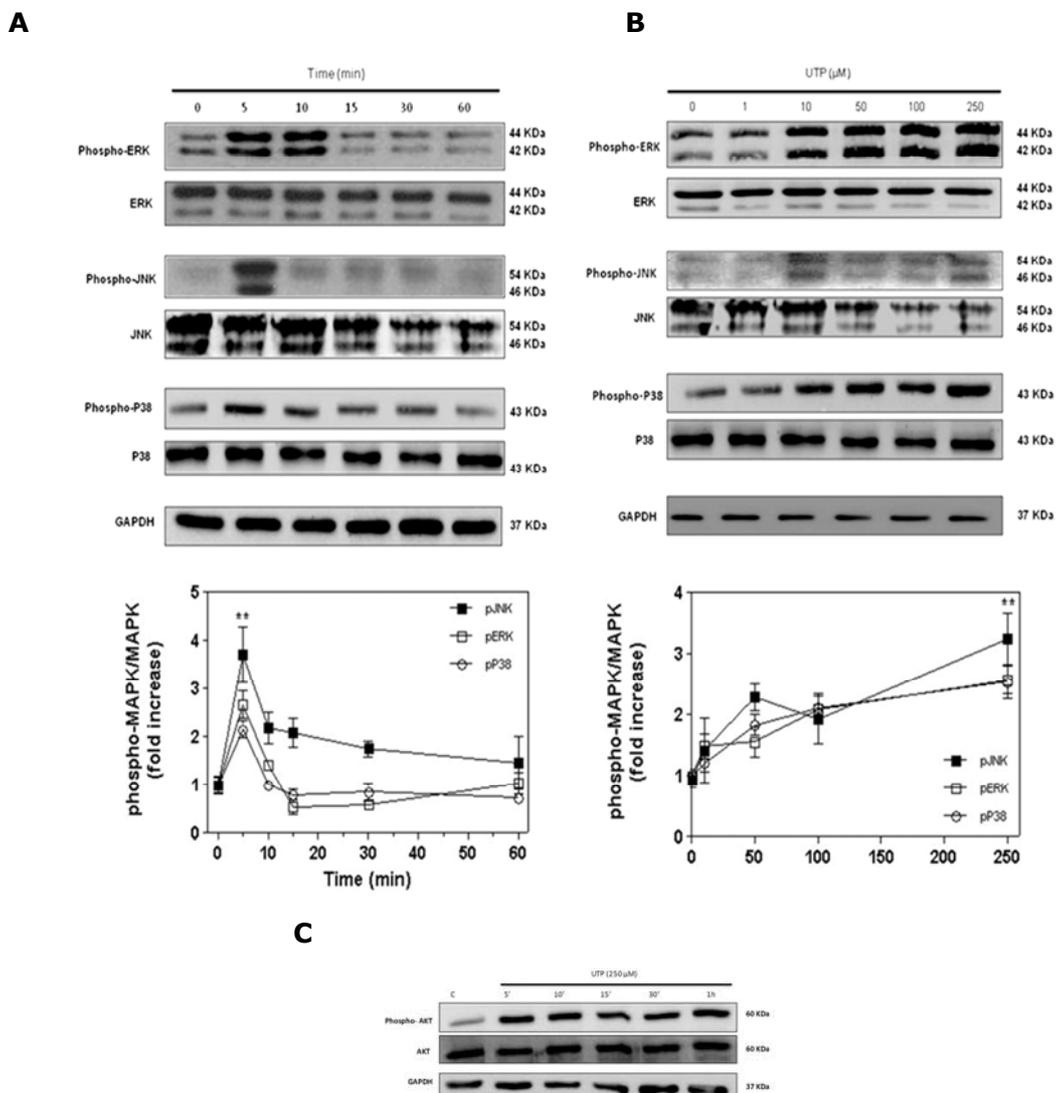
**Figura R9. Los receptores purinérgicos median la sobre expresión de N cadherina por parte del UTP extracelular. (A)** Las células RT4D6P2T se trataron con 250  $\mu$ M de UMP, 250  $\mu$ M de UDP, 250  $\mu$ M de UTP o 250  $\mu$ M de ATP durante 24 horas y los lisados se analizaron mediante Western blot para N cadherina y GAPDH. Se observó un incremento significativo en la expresión en presencia de UTP y ATP. Se muestra la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes ( $^*p\leq 0.05$ ). **(B)** El pre tratamiento con suramina inhibió la sobre expresión de N cadherina en células RT4D6P2T y en células de Schwann de cultivos primarios. Se trataron las células con 250  $\mu$ M de UTP en presencia o ausencia de 100  $\mu$ M de suramina durante 24 horas. Se analizaron los lisados mediante Western blot utilizando anticuerpos contra N cadherina y GAPDH. Se muestra la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes ( $^*p\leq 0.05$  respecto control,  $^{\#}p\leq 0.05$  respecto tratamiento con UTP).

#### 4. El UTP extracelular induce la activación de MAPK en células de Schwann

Se ha descrito que los receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina pueden activar la vía de las MAPK a través de la activación de PKC (Graham et al. 1996). Para determinar si la sobre expresión de N cadherina era mediada a través de alguna de estas cascadas de señalización, se estudió previamente la fosforilación y activación de tres MAPK: ERK 1/2, JNK y P38 en presencia de UTP extracelular. Se trataron las células con 250  $\mu$ M de UTP a distintos tiempos y se observó un incremento de la fosforilación de las tres MAPK (2.3 veces de incremento en la fosforilación para

P38, 2.9 veces para ERK1/2 y 4.2 veces para JNK,  $p \leq 0.01$ ) transcurridos tiempos de entre 5 y 10 minutos de tratamiento (**Figura R10-A**). Las tres MAPKs también se activaron de forma dosis dependiente tras el tratamiento con diferentes concentraciones de UTP (rango de 1 a 250  $\mu\text{M}$ ) durante cinco minutos. Se observó que concentraciones a partir de 10  $\mu\text{M}$  eran capaces de inducir su fosforilación (**Figura R10-B**). No sólo ERK1/2 se activó en presencia de nucleótidos extracelulares (como ha sido descrito ampliamente en otros estudios (Arslan et al. 2000)), sino que también se fosforilaron dos MAPK relacionadas con estrés extracelular como son JNK y P38.

De forma paralela y debido a que se han descrito otras vías de señalización activas en presencia de nucleótidos extracelulares tales como la vía PI3K/AKT, se trataron las células RT4D6P2T a diferentes tiempos con 250  $\mu\text{M}$  de UTP y los lisados fueron analizados por Western blot utilizando un anticuerpo contra AKT. Se observó tal y como se muestra en la (**Figura R10-C**) la activación de esta vía de forma constante a partir de los cinco minutos en presencia del nucleótido UTP.



**Figura R10. El UTP extracelular induce la activación de MAPK y AKT en células de Schwann. (A)** Las células RT4D6P2T se trataron a diferentes tiempos con 250  $\mu\text{M}$  de UTP. Los lisados se analizaron mediante Western blot con anticuerpos contra tres MAPK (ERK1/2, JNK y P38) en sus formas fosforiladas y totales y GAPDH como control de carga proteica. La actividad de las MAPK se expresa como la razón entre la forma fosforilada y la

forma total, y el control se asignó como 1 grado de actividad. **(B)** Las células RT4D6P2T se trataron con diversas concentraciones de UTP durante 5 minutos y se realizaron Western blots para cada una de las MAPK y GAPDH. Los datos de ambos experimentos muestran la media  $\pm$ SD de cómo mínimo cuatro experimentos independientes (\*\* $p \leq 0.01$ ). **(C)** Las células se trataron con 250  $\mu$ M de UTP a diferentes tiempos y los lisados fueron analizados para la quinasa AKT (forma fosforilada y total) y GAPDH. Se muestra un inmunoblot representativo de dos experimentos independientes.

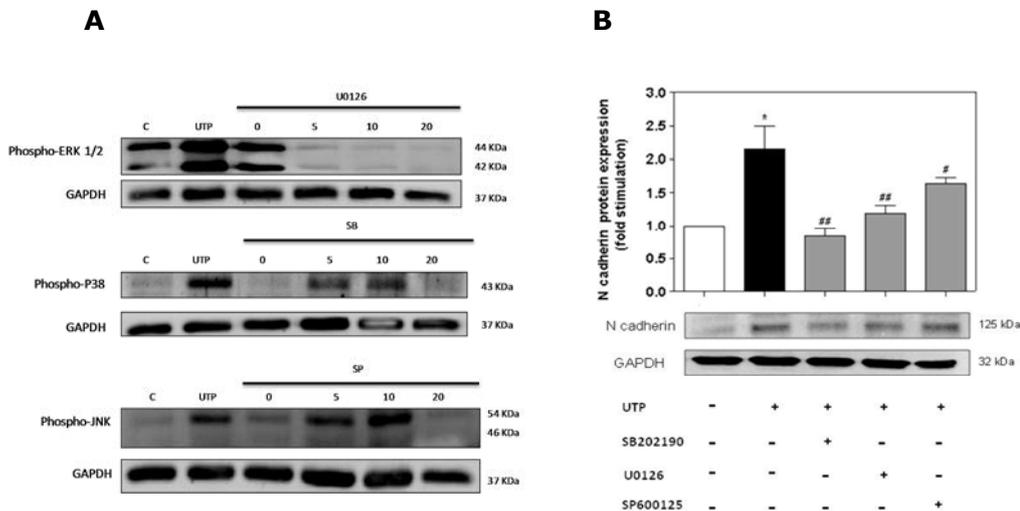
### 5. La señalización de las MAPK regula la expresión de N cadherina

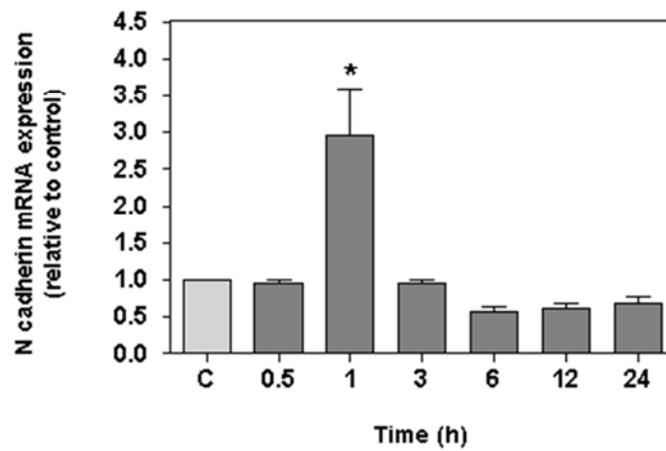
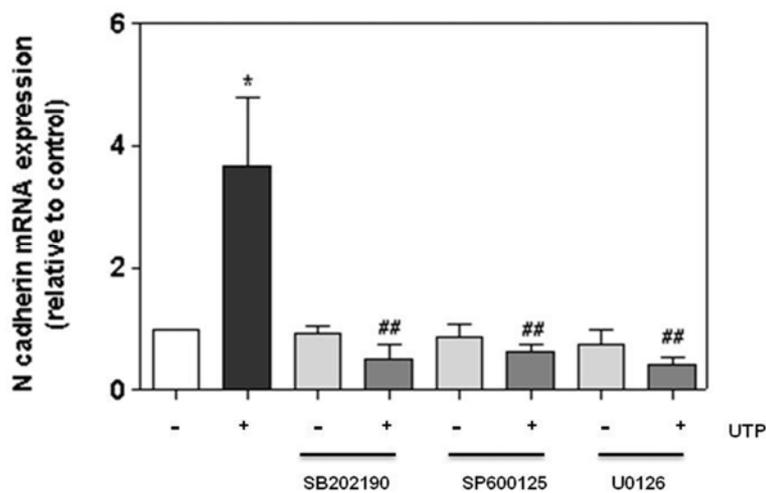
Para determinar concentraciones no tóxicas de los inhibidores selectivos para MAPK, se pre trataron durante 30 minutos las células con concentraciones crecientes (5, 10 y 20  $\mu$ M) de inhibidores para cada una de las MAPK: el U0126, un inhibidor de MEK 1/2 (quinasa reguladora que fosforila ERK1/2); el SB202190, un inhibidor de P38 o el SP600125, un inhibidor de la quinasa JNK, antes del tratamiento con 250  $\mu$ M de UTP. Se escogieron concentraciones de 10  $\mu$ M para los inhibidores U0126 y SB202190; y de 20  $\mu$ M para el inhibidor SP600125 **(Figura R11-A)**.

Posteriormente se trataron las células RT4D6P2T en presencia de los tres inhibidores selectivos y con UTP durante 24 horas para determinar qué MAPK estaba implicada en la sobre expresión de la proteína de adhesión N cadherina, las células RT4D6P2T se pre incubaron durante 30 minutos con los inhibidores para cada una de las MAPK y se trataron con 250  $\mu$ M de UTP durante 24 horas. La inhibición independiente de cada una de las MAPK provocó una disminución en la expresión de N cadherina mediada por el UTP extracelular. La disminución fue mayor cuando se inhibieron las MAPK P38 y ERK1/2 ( $p \leq 0.01$ ). En contra, se observó una menor inhibición en la expresión (pero también significativa,  $p \leq 0.05$ ) cuando se inhibió la quinasa JNK **(Figura R11-B)**.

Finalmente se examinaron los incrementos de N cadherina a través de UTP a nivel transcripcional, las células RT4D6P2T se trataron con o sin 250  $\mu$ M de UTP durante varios tiempos abarcando desde los 30 minutos hasta las 24 horas, se extrajo el RNA total y se cuantificó mediante PCR a tiempo real la expresión de N cadherina. A pesar de presentar un incremento en los niveles de la proteína N cadherina a las 24 horas (véase **Figura R8-B** del apartado 2), los niveles de mRNA incrementaron transcurrida 1 hora de tratamiento con UTP ( $p \leq 0.01$ ) **(Figura R11-C)**. La pre incubación con cada uno de los inhibidores selectivos para las MAPK provocó además una disminución significativa ( $p \leq 0.01$ ) de los niveles de mRNA de N cadherina en presenc

ia de 250  $\mu$ M de UTP durante 1 hora de tratamiento **(Figura R11-D)**.

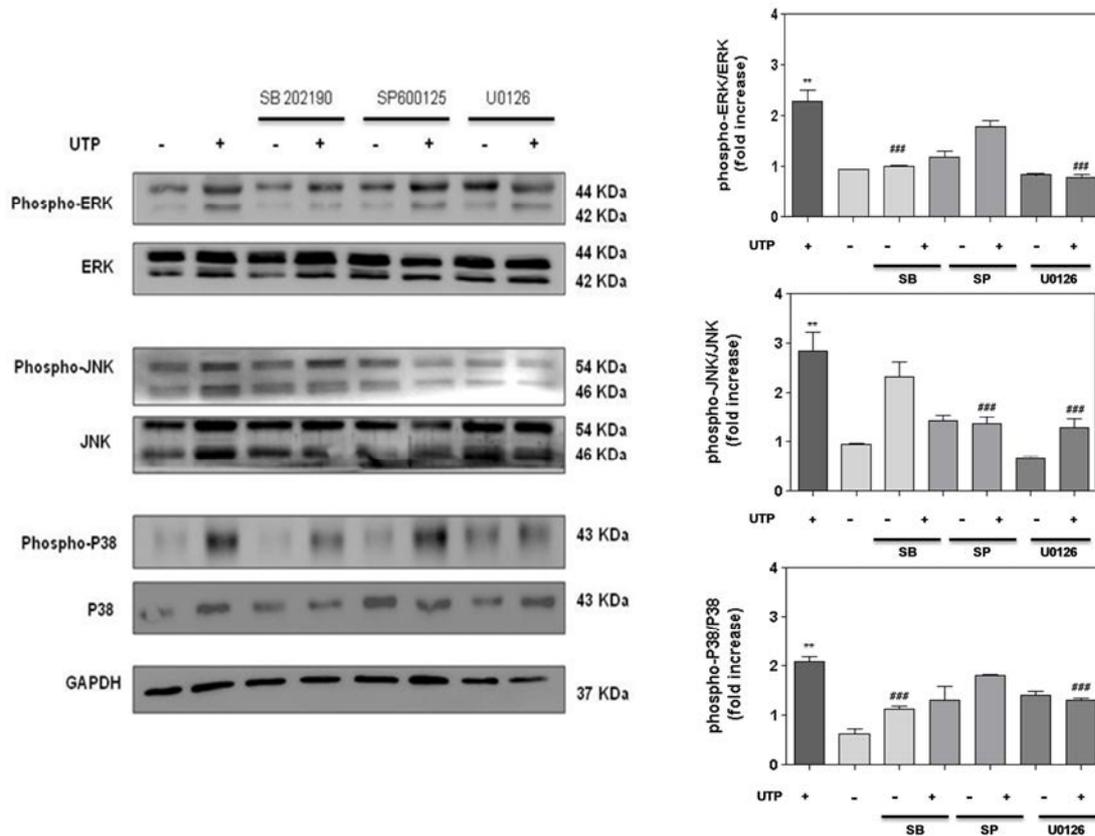


**C****D**

**Figura R11. La actividad de las MAPK induce la sobre expresión de los niveles de mRNA y de proteína N cadherina mediada por UTP. (A)** Las células RT4D6P2T fueron tratadas con diversas concentraciones de los inhibidores selectivos (5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) para cada una de las MAPK antes del tratamiento con 250  $\mu\text{M}$  durante 5 minutos. Los lisados se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos contra cada una de las MAPK fosforiladas y GAPDH. Se muestra un inmunoblot representativo de tres experimentos independientes para cada una de las quinasas. **(B)** Las células fueron pre tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de los inhibidores U0126 y SB o 20  $\mu\text{M}$  SP antes del tratamiento con 250  $\mu\text{M}$  de UTP durante 24 horas. Se analizaron los lisados mediante Western blot contra N cadherina y GAPDH. **(C)** Las células RT4D6P2T se trataron con 250  $\mu\text{M}$  de UTP a diferentes tiempos y el RNA total se analizó mediante PCR a tiempo real. Se utilizaron como genes de referencia GAPDH y  $\beta$  tubulina. Se muestra un aumento significativo de los niveles a la hora de tratamiento ( $*p \leq 0.05$ ). **(D)** Se pre trataron las células RT4D6P2T con inhibidores selectivos para cada una de las MAPK antes de tratar con 250  $\mu\text{M}$  de UTP durante 1 hora. Los niveles de mRNA de N cadherina en presencia o ausencia inhibidores selectivos para cada una de las quinasas fueron cuantificados mediante PCR a tiempo real. Se utilizaron como genes de referencia GAPDH y  $\beta$  tubulina. Los datos muestran la media  $\pm$ SD de cómo mínimo tres experimentos independientes ( $*p \leq 0.05$ ;  $\#p \leq 0.05$ ;  $\#\#p \leq 0.01$ ).

## 6. Selectividad de los inhibidores de las MAPK en presencia de UTP extracelular en las células de Schwann.

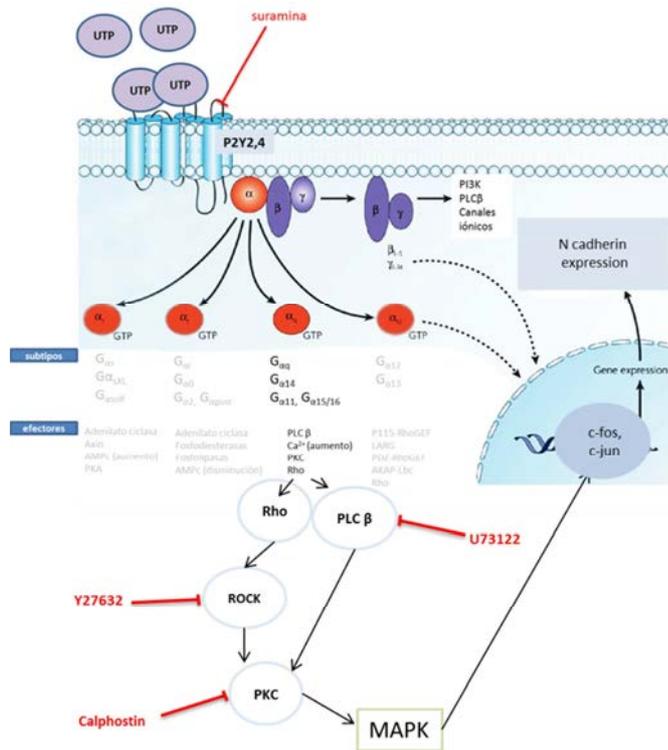
Debido a que la inhibición de cada una de las tres MAPK provocaba una disminución de la expresión de N cadherina de forma independiente, se comparó respectivamente la selectividad o presencia de reacciones cruzadas de cada uno de los inhibidores utilizados en presencia de UTP extracelular. Para ello, se trataron las células RT4D6P2T con los tres inhibidores anteriormente empleados y se analizó la activación de las tres MAPKs mediante Western blot. Como puede observarse en la **Figura R12**, el inhibidor U0126 no inhibió solo la MAPK ERK1/2, ya que también provocó una inhibición de las quinasas P38 y de JNK. Por otro lado, se observó una ligera inhibición de la quinasa JNK en presencia del inhibidor selectivo para P38 después del tratamiento con UTP. Estos resultados pueden deberse a una baja selectividad de los inhibidores o bien, a la existencia de activaciones cruzadas entre las tres MAPK.



**Figura R12. Visualización de la selectividad de los inhibidores de las MAPK o posible activación cruzada entre ellas en presencia de UTP.** Antes de tratar las células con 250  $\mu$ M de UTP, se pre trataron con 10  $\mu$ M de U0126 (inhibidor de MEK/ERK1/2), 10  $\mu$ M de SB202190 (inhibidor de P38) o con 20  $\mu$ M de SP600125 (inhibidor de JNK). Transcurridos cinco minutos de tratamiento con 250  $\mu$ M de UTP, los lisados se analizaron mediante Western blot con anticuerpos contra cada una de las MAPK en sus formas fosforiladas y totales y el control GAPDH. Se muestra la media  $\pm$ SD de tres experimentos independientes (\*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001).

## 7. La activación de las MAPK por parte del UTP depende de la actividad de los receptores P2Y

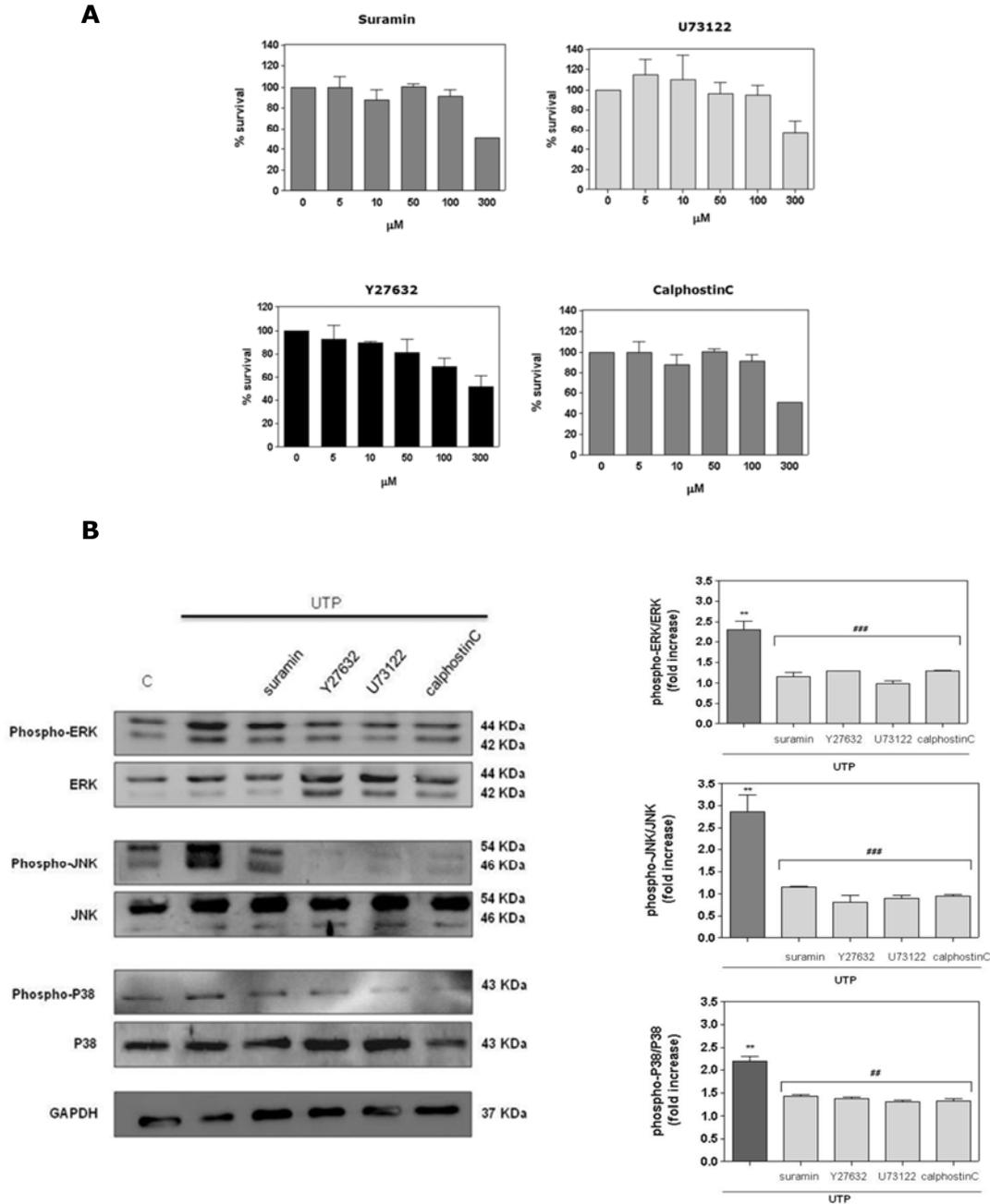
Por otro lado, para determinar si la fosforilación de las tres MAPK en presencia de UTP extracelular era mediada a través de la activación de los receptores metabotrópicos P2Y, se trataron las células con cuatro inhibidores selectivos para diversas proteínas implicadas en la vía de señalización purinérgica (**Figura R13**).



**Figura R13.** Inhibidores utilizados contra proteínas involucradas en la respuesta de receptores P2Y en presencia de UTP. La interacción del UTP con receptores metabotrópicos P2Y2 y 4 acoplados a proteínas G<sub>q</sub> triméricas provoca la disociación de estas y la activación de diversas vías. Sus subunidades se disocian, por un lado la subunidad alfa activa vías tales como PLC, ROCK y estas a su vez aumentan la cantidad de diacil glicerol (DAG) y se activa la proteína quinasa C: PKC. Tanto la inhibición del receptor metabotrópico como de estas tres proteínas (PLC, ROCK y PKC) en nuestro modelo conllevó a una inhibición en la fosforilación de las MAPK P38, ERK1/2 y JNK. Suramina: antagonista de receptores P2; Y27632: inhibidor de la proteína quinasa "Rho associated protein kinase", ROCK"; Calphostin: inhibidor de la proteína quinasa PKC; U73121: inhibidor de fosfolipasa C β (PLC).

Como se ha descrito anteriormente, la suramina es utilizada como un antagonista no selectivo de receptores P2 (Abbracchio et al. 2006). La mayoría de receptores P2Y están acoplados a proteínas Gq (Burnstock 1996). Debido a la observación de cambios en el citoesqueleto de actina en presencia del nucleótido UTP (véase Capítulo I de resultados), se analizó si la activación de la quinasa ROCK (a través de la activación de la proteína RhoA), la activación de PLC (a través de la subunidad α de la proteína G) y la activación de PKC (a través del DAG resultante de la hidrólisis del inositol bifosfato) se encontraban involucrados en la activación de la vía de las MAPK. Las células RT4D6P2T se pre incubaron con las siguientes concentraciones no tóxicas: 100 μM de suramina, 10 μM de Y27632 (inhibidor de la "Rho associated protein kinase" ROCK), 10 μM de U73122 (inhibidor de fosfolipasa C, PLC) o 10 μM de Calphostin C (inhibidor de la proteína quinasa C, PKC) (**Figura R14-A**) antes del tratamiento con 250 μM de UTP durante 5 minutos. Los lisados se analizaron con

anticuerpos contra las formas fosforiladas y totales de cada una de las MAPK. Se inhibió la fosforilación de ERK1/2, P38 y JNK mediada por UTP en presencia de suramina y en presencia de los inhibidores de la quinasa ROCK, de la PLC y de PKC (**Figura R14-B**). De forma que la respuesta mediada a través de Gq-RhoA, PLC y PKC es anterior a la vía MAPK y las tres están involucradas en su fosforilación y activación.



**Figura R14. La vía purinérgica induce la fosforilación y activación de las MAPK en células de Schwann.**

(A) Se determinó la viabilidad celular mediante MTT en presencia de diversas concentraciones (0-300  $\mu\text{M}$ ) de los inhibidores Suramin, U73122, Y27632 y Calphostin C. El control representa el 100% de viabilidad. Se muestran resultados de la media  $\pm$ SD de dos experimentos independientes. (B) Antes de tratar las células con 250  $\mu\text{M}$  de UTP, se pre trataron durante 30 minutos con inhibidores selectivos para diferentes proteínas implicadas en la señalización purinérgica: 100  $\mu\text{M}$  de suramina, 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor de RhoA quinasa (Y27632); 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor de fosfolipasa C (U73122) o 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor de la quinasa PKC (CalphostinC). Transcurridos 5 minutos de tratamiento con 250  $\mu\text{M}$  de UTP, los lisados se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos contra

cada una de las MAPK fosforiladas y totales y el control GAPDH. Los datos de cómo mínimo cuatro experimentos independientes están representados como la media  $\pm$ SD (\*\* $p \leq 0.01$ ; ## $p \leq 0.01$  y ### $p \leq 0.001$ ).

## 8. Importancia de los sitios de unión AP1 en la expresión de N cadherina a través de la señalización purinérgica

No existe mucha información sobre cuáles son los factores y mecanismos que regulan la expresión de N cadherina en células gliales o neuronales. Algunos estudios correlacionan la expresión de N cadherina con los genes *twist* y *snail* durante la gastrulación en el modelo de *Drosophila* (Oda et al. 1998). En condrocitos se ha observado que el factor de transcripción Sox 9 es capaz de regular el promotor de N cadherina (Panda et al. 2001), y que los esteroides gonadales aumentan los niveles de mRNA en el hipocampo de rata y en neuronas motoras (Monks et al. 2001). En estudios con células de Schwann se ha visto la implicación de las moléculas heregulina y neuregulina en su expresión (Wanner et al. 2006c).

Para realizar estudios sobre la implicación del UTP en la actividad del promotor humano de N cadherina se analizó, en primer lugar, la actividad del promotor humano de N cadherina en células de Schwann RT4D6P2T. Para identificar la secuencia del promotor necesaria para la transcripción basal del promotor de N cadherina humano en células de Schwann RT4D6P2T, se examinó mediante el uso del gen reportero luciferasa la actividad de diferentes deleciones generadas mediante el uso de endonucleasas en el extremo 5' del promotor de N cadherina. En la **Figura R15, indicado con flechas** se muestran las diferentes deleciones utilizadas.

```

-3698 GTGAATTTGT ACATTAGCA TCTCTGCTT GACAAAACAC ACCAGAACAA AAATTATTAC GATTTTCGAA ATGAATGCTT AGAAACAAT
TATA box TATA box
-3608 CATGATCTCT ACACACATAT AAAAACTACA CATAATATATA AATGAATGCT TAGAAATGAA TGATCGTGAC CTCTACATAT ATATAAAAAC
-3518 GGGCCADGTG TTCAGAGCAC ATCAATTAAAT CAGGTTTCCA TAAAGGTTTG CAGACCTCTT ATAGTCAACA GGCATCACTC CATAGGTCAG
-3428 AAATGAAGGA TTAGGTTGAT TGGAGAGGAG TGAATGCAGT CATGTTTAT ATATTCTAT ATTTTTTCTT TGCTCCACTC CATCCAAACC
E box
-3338 CTAATAACAC CTGCTTGTCT CTCTGGGTCA CAGACAATCC CCTACATCCC TGGAGTCTTA CAGGCTGATG GAAACCAAGT CTTCAGACAA
-3248 GTAATGCTTT GAGCAGGGCC TAAAAATCTG CAGGTTTGTG CATCAGTTTC CCAGGACAGT GAATGCGCCC GATAGCTAAT CTTAAGTATG
-3158 GTATTACTGA GGTAAAGCTG TGTTTGGATA TCATAGTCAA CACCAGATCT ACTTTCATTA ACATCAAATG GATGCAAAA GTCTCCAAAC
Sox3
-3068 GCATGATTTT AGACTAGACT ATTCCCTCTT GTAATCAGAG GCTTATTATT TATTATTAGC AAGATTGGC TGGCCAGGTG ATDACTTAA
-2978 AGTGAGGCAA GATGCTAAAA CAATTCACAA CCACGTGAAGA GTGAGAGCCA TGCAAAATGG ACTTTTAAAA CATGTCGAA GTGCTTACTT
-2888 AAAGATCAA AAAGCTTGG AATCAGAGAA TTCTTACTT GACAGCCATT CCAAAGAGA TTTTGAATC ATAGTGTCTT AATTATAAA
-2798 GGACATGTTT AAAGCTTCAA GTAATACTA CTAACAGAA ATAGAGTTAT TCATGTTGAA ATTGTTCCA CCTTTAAATT AATCAGAAAG
-2708 GCAATAAACA TCAATGGTGA CTCTAGGAG TGAATGAGAT ACAATCGAAA CCCCACAGC AGGCTGAAAG CTTAAATCTT AGCCATGGAG
GATA3
-2618 ATGAGATCTC TACATCTCAC TCTGGAATAC AACAACATA TCCCATATC TCAACTGAAT TTTTACTATT ATTTTGATG ACTCCCGAA
-2548 AGCATAATT ATAAATACTC TATTCAGAG ATAACTTTTA GCGGACAGTAA CAATAGTGTG ACAATAATAT CTAGCAAAA AAGAGAGAA
-2438 AGGTAAGAA CAAGCACTTC TGATTACTAT ATTAAGTGTG TCATCTCATC TTTTAAATTT AATTAACATA ACCTTTCTTA TCTTTTGAA
-2348 AAGAAAGAAA ATCCAGGAAA AATTTTGTG CATAAAAAAC TTACAATATT ATGTTTTAAT TAAATGAAA TAAGCTCCC TATGAATATT
-2258 AAATTTTAAA AAGCCTAGCC AGCAACAGTA CATTATTTAA AGCTGTATG CAAAGAGAAA GAAATAGTA GCTGTGTTT AAAGGTTTAT
-2168 CATCAGATTC TTAATGATC GGTATCTTGA AACTCAAATA AAGTTAACT TCCAGTCTCA CAAGACGAAA AAGCAAGCAA TAAAGCCGA
-2078 AAATATTAT TAACCTGCAAT GAAGTTCACC GATCTCCAAA GTGTTGAAA GCTTACATAA AACGGTATT TCTATTACT TGTAAAACCT
-1988 TCTTAAAAA GGTTCGAAA AATTTATTAC CTCACCGAAA TTAGAAAAAA CAAAAACTCC TCCCATCCC CCGCTCAAT CCACAAATGC
AP1
-1898 TGGAGAGGAG AACTTGGAAA GTCTCTCACT GTDTTGCAT TGAAGTTCAT GCCTTAAAGG AAGCCAGCAG AAATCCCTTA CTGGTGTGGA
AP1 GATA3
-1808 ATCTGTCTC AGTCATCTA TCTCTTATAT AATCTTATT TCTCAAGTTC CCGCTTTTAG TTTCTCTCTT TTTTAAAAA TGTFTTTAGG
-1718 GGTGGTAGGA GAGGTAJAA GTACCTGAA ACTGTGCCC CCAATGTGA ACAGTACCAC TAAAGGTAG TAATAGAAAT AGAAAAGGG
-1628 AGATTTCAA TAAATAACA AACATGCACT CTCAAACTCC CAGAGGGGAC AAAGAAAAC AAACAAGAA CAAAAAATC TGGGCTGTTC
E box
-1538 CAGTACATCC TCAAGGTTGG GAGCTGAAGG TCGAGCTCC AGAGAGGAGC CCGGCTCTCC GCGCTCCCC GCGCCAGAT GCGCTCCGCG
Sox5
-1448 GAGCCCTCA GACACAAATA GCTAGATGA GCTTGGGCTG CGTCTTAGT TTGCTGTGTC TGCCCTGAC AGGAAGATT ACCCATCTCC
MZF1
-1358 AAAGATGAC AAAATAAGA AGCTACUTT AGGCTCCCAA GGAGACAGC CCCCCCTTC CCCCCTTTC TTCACTCCA TTAGATTCCC
E box
-1268 TACCOCGAC CAAAGATGAA CTTGCTACA ATCAAGTTCC TGCCCAAGT ATTTTATTTC CCGCAGCCCC TCCACTGCC GCGGCGTCCG
Sp1
-1178 TGCGGCACT CTAGGCTTCC CTCGCGGAC CCCCCCGGG CTCAGCAAA ATACGGGGGG CTTTGGGGG GGGGGGGGG GCGGCTGCG
-1088 CAGATCCGCG CCGCTCAGC CCGAGCTTG TGCGCTCGA TTGCGCAGA CCGCGGGGG GAGCTCCGCG GAGGAGGGA GCGCGGGGCG
-998 AGGCGCGCG CCGCGCGCG AGAATAGGA GAGGGAGCG GCGCGCGAG CCGAGCAGCG COTGGGGGA GCGCGGGGAG AGCGCGCGCG
-908 GCTCCCGAG GTCCCGCAG CCGAGCCGAG CCGGTTCCG GTCCCGCAG CCGAGCGCG CCGCGCGAGT GAGCGCGCA GCGCGAGCAG
-818 CCGCGCGCG GTCCCGTCC CCGCGCAGA CCGCGCGCG CCGCAGCAG TCGCGCGAG CCGAGCGCG CCGCGAGAG CCGCGCGCGCG
-728 CCTCCCTCA CCCCCCTCC CCGCGCGCG GAGAACAGTC TCCACTCCG CCGGGGACCG GAAGAGGAG CCGAGAGCG CCGCGCGCGC
-638 CCCACCGAG CCGAGCGCG AGTGGCGGA CTGCTGCTT TTGTGGTGC AGCAGCGAG ACCCGGAGC CCGTCCCGCG GCGCTGCTC
-548 CCGCGCTCT CCGCGCGCG AGCGCGCTG GAGCGGGAG CCGAGGAGG CAAACACAG ACCCGGAAAC CTCGCTGCG GAGCTCTTG
-458 GGGAGCGCA TCCGCTCAC TTCACCTCC ACATCCTCCA CCGGCAAG TCCCGCGCG TGCATCCCT CGCGCTTCC GCGCGCTCG
Sp1
-368 GCGCGGAGC GAGCGCGCT CCGTCCACA CCGAGCGCTT CACACACTC CAGACGCTC ACAGGCTCTC CCGCGCTT CCGCGCGCGC
-278 TCCCGAGCT CCGTGTCTC TGCGTCTGT TATTACTCC TGCGCGAGT CCGCGGAGT CCGCGCGCG CTTATTGTA TCAAGCTCGC
-188 CTCGATGCG CCGAGCGGA GAGCAGGAA GAAAGGCGTG GCGGCGGAG GCGAAAGGAA GCGGCGGAA ACTGCGTGA CCGCTTCTC
-98 CCGCGCGCG TTGCGTCCG CCGTCCCTC TCCCTCCCG CCGCGCGCG CCGCGCGCG CCGCTCTCGG GCGCGCTCGG GCGCGCGCGC
+1
-8 GAGGAGGAG gtgcggata gcggagagcg tgcggacct gctgccgtg ctggcgccc tgcctag

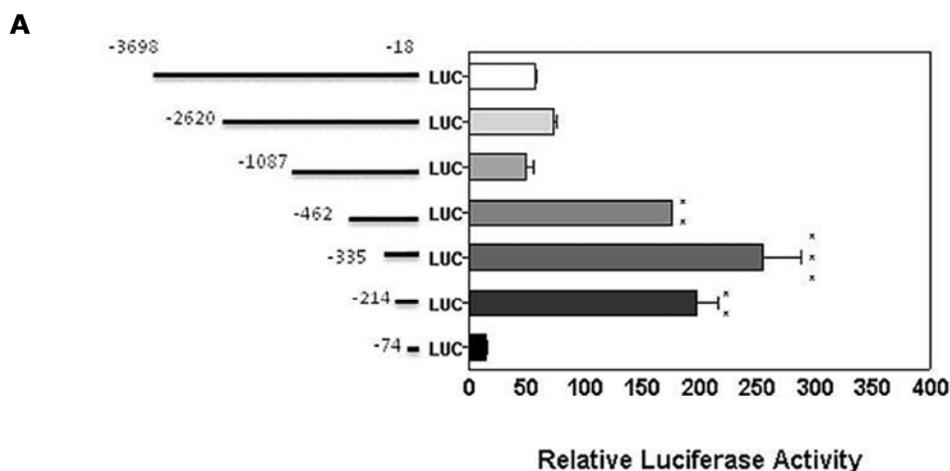
```

**Figura R15. Lugares de unión de los factores de transcripción y deleciones generadas para la secuencia del promotor de N cadherina humano. (A)** Secuencia nucleotídica de la región 5' y del exón 1 (en negrita) del gen de la N cadherina. El ATG de inicio es mostrado en negrita y se asignó como +1. Los posibles sitios de unión de varios factores de transcripción son mostrados en gris. Las flechas indican los sitios de deleción del promotor utilizados en los estudios del capítulo II. En recuadros rojos se muestran los sitios de unión de AP-1. El número de acceso del promotor de N cadherina en el GenBank es AY512658.

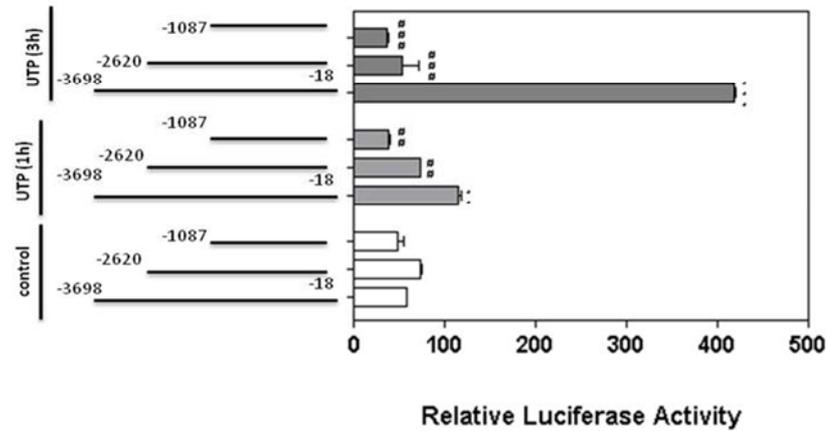
Los fragmentos obtenidos se clonaron en el plásmido pGL3 bajo la actividad del gen *reporter* de la luciferasa y los constructos se transfectaron de forma transitoria en células RT4D6P2T. Tal y como se muestra en la **Figura R16-A** la transfección durante 48 horas del constructo pGL3 -3698/-18 (la secuencia completa del promotor) provocó un incremento en la actividad del promotor de 55 veces respecto el pGL3 básico vacío. Las deleciones progresivas del promotor desde -462 al 214 provocaron un aumento en su actividad, seguramente debidos a presencia de elementos represores en estas zonas. La deleción -74 provocó una disminución considerable en la actividad del promotor. Por lo tanto, la zona comprendida entre 214 y 74 contenía elementos *cis* esenciales en la transcripción de N cadherina y la mínima secuencia para tener expresión en las células de Schwann abarcaba los nucleótidos desde la posición 214 a 18.

Con la finalidad de analizar si la presencia de los sitios de unión AP-1 son necesarios en la regulación del promotor por UTP, se transfectaron las células con los plásmidos pGL3 3698/-18 (secuencia completa con cuatro sitios de unión AP-1); pGL3 2620/-18 (menos un sitio de unión AP-1) o pGL3 1087/-18 (sin ningún sitio de unión AP-1) y fueron tratadas con 250  $\mu$ M del nucleótido UTP durante 1 o 3 horas previas al ensayo luciferasa. Tal y como se muestra en la **Figura R16-A** transcurridas 1 hora se producía un aumento significativo de la actividad del promotor de N cadherina humano (de hasta 2 veces) en presencia de UTP respecto al control; por otro lado, también se encontró un aumento significativo a las 3 horas de tratamiento con UTP (de hasta 7 veces). En contra no se visualizó ningún aumento en la actividad de los promotores con ausencia de sitios de unión AP-1 en presencia de UTP extracelular, ni incluso a las 3 horas de tratamiento (**Figura R16-B**).

Los resultados obtenidos con el constructo pGL3\_1087/\_18 y con el constructo pGL3\_2620/\_18, indican que es necesario como mínimo un sitio de unión AP-1 para que el promotor se active en presencia de UTP extracelular.



## B



**Figura R16. (A) Identificación de la región mínima requerida para la actividad basal del promotor humano de N cadherina en células de Schwann.** Las células RT4D6P2T se cotransfectaron con una serie de delecciones del promotor humano de la N cadherina en el extremo 5' clonados en pGL3 con actividad luciferasa, con el vector pGL3 vacío y con el vector pRL-TK con actividad renilla. La actividad luciferasa se visualizó transcurridas 48 horas y se normalizó con la actividad renilla. Los datos representan la actividad transcripcional en relación al plásmido pGL3 vacío. Los resultados muestran la media±SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado (\*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , respecto a la secuencia completa -3698\_-18). **(B) Importancia de los lugares de unión AP-1 en la regulación del promotor de N cadherina por el nucleótido UTP extracelular.** Las células RT4D6P2T se cotransfectaron con el constructo pGL3 con la secuencia entera del promotor de N cadherina humano (pGL3 -3698) o con dos constructos del promotor de N cadherina delecionados en zonas de localización de sitios de unión AP-1 (constructo -2620, menos un sitio de unión AP-1; y constructo -1087, menos tres sitios de unión AP-1) juntamente con el plásmido pRL-TK con actividad renilla. Transcurridas 48 horas, se trataron las células con 250  $\mu\text{M}$  del nucleótido UTP durante 1 hora (en gris) o 3 horas (en negro) y se midió la actividad luciferasa mediante el luminómetro. La actividad luciferasa fue normalizada con la actividad renilla. Los datos representan las actividades transcripcionales en relación al plásmido pGL3 vacío. Los resultados muestran la media de los valores  $\pm$ SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado (\*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

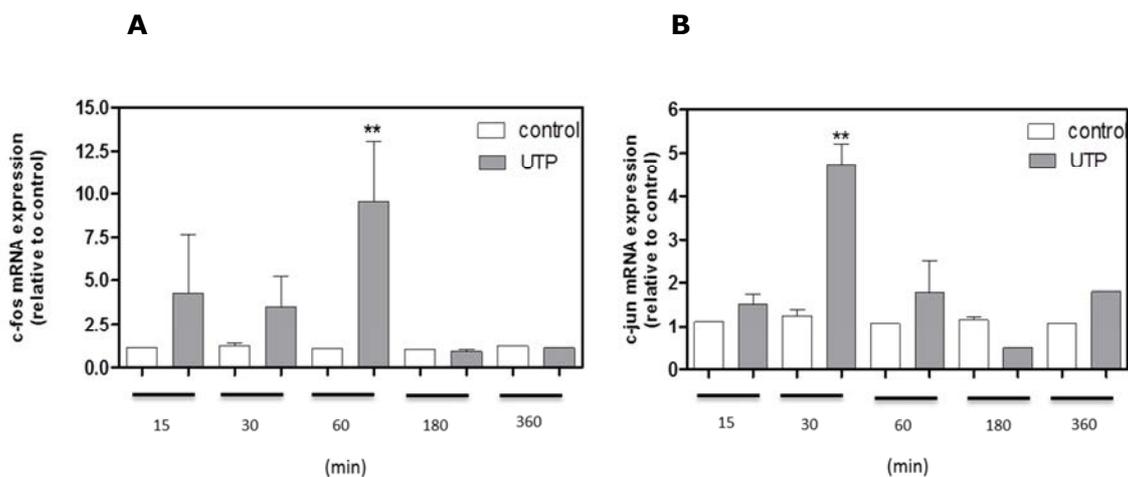
### 9. Incremento de la expresión y la fosforilación de los factores de transcripción c-fos y c-jun en presencia de UTP extracelular en células de Schwann

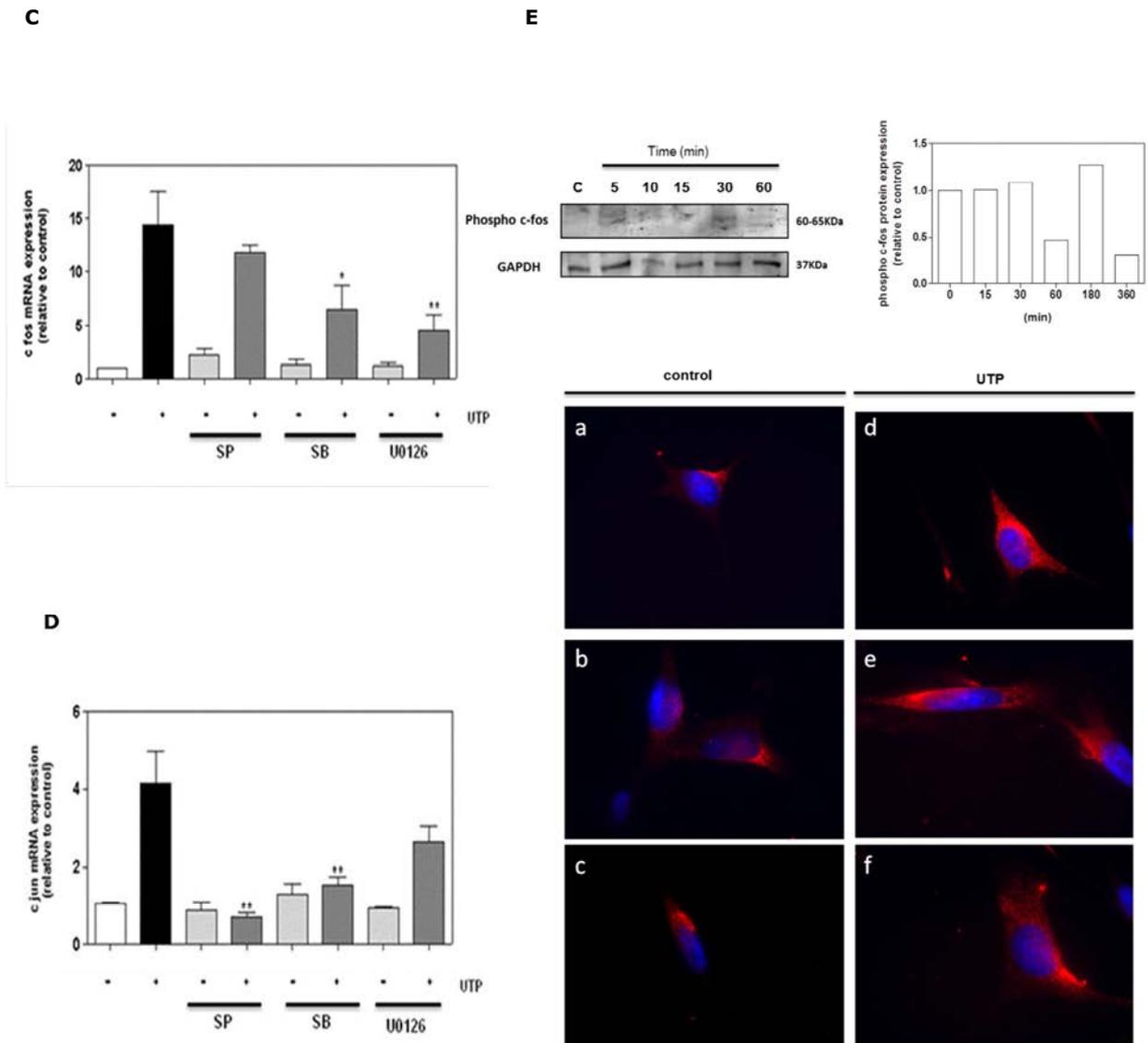
Debido a la activación de cascadas de señalización por factores mitogénicos, estreses, o moléculas extracelulares, se induce un incremento en la expresión de genes tempranos tales como c-jun y c-fos que regulan la expresión de genes de respuesta (Whitmarsh et al. 1996). Así, se ha descrito que cascadas de señalización como la vía de las MAPK pueden regular y activar mediante fosforilaciones genes tempranos (Tanos et al. 2005, Karin 1996). Los sitios de unión AP-1 (*Activating Protein 1*) unen complejos dimérico cuyos componentes son las proteínas proto-oncogénicas: c-Jun y c-Fos. Este complejo se estructura normalmente por homodímeros de proteína c-Jun o heterodímeros de las proteínas c-Jun y c-Fos. Estos dímeros son capaces de unirse a lugares reguladores en el DNA (elementos de respuesta *tetradecanoylphorbol acetate responsive elements (TRE)* o sitios de unión AP-1) y regular la transcripción de diversos genes (Lu et al. 2002)(Karin 1996).

Dada la presencia e importancia de lugares de unión AP-1 en el promotor de N cadherina, se examinaron los niveles de expresión de los genes tempranos c-fos y c-jun en presencia de UTP. Las células RT4D6P2T se trataron a diferentes tiempos con 250  $\mu$ M de UTP y se determinó la expresión de c-jun y c-fos mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Se observó una sobre expresión de ambos factores de transcripción transcurrida 1 hora de tratamiento (para c-fos 12.7 veces y c-jun 5.1 veces de incremento,  $p \leq 0.01$ ) (**Figura R17-A, B**). Esta sobre expresión coincidió con la sobre expresión a nivel de mRNA de N cadherina, la cual también tuvo lugar a la hora de tratamiento con 250  $\mu$ M de UTP (**Figura R11-C, apartado 5**). Estos datos corroboraron que la presencia de ambos factores de transcripción son importantes en la regulación del gen de N cadherina a través del UTP extracelular.

En segundo lugar, para confirmar la implicación de la actividad de las MAPK en la regulación de estos factores, se pre incubaron las células RT4D6P2T con inhibidores para cada una de ellas y se cuantificaron los niveles de mRNA para c-fos y c-jun transcurrida 1 hora de incubación con 250  $\mu$ M de UTP. Se observó una reducción significativa en los niveles de expresión de c-fos cuando se inhibían las quinasas ERK1/2 (de 17.5 veces a 6.2 veces,  $p \leq 0.01$ ), y P38 (de 17.5 veces a 8.5 veces,  $p \leq 0.05$ ), en cambio, la inhibición de la quinasa JNK no redujo los niveles de c-fos (**Figura R17-C**). En contra, tal y como se muestra en la **Figura R17-D** sí se observó una disminución en la expresión de c-jun en presencia del inhibidor de JNK y de P38 (de 4.6 veces a 1.4 y 1.9 respectivamente,  $p \leq 0.01$ ) pero no una disminución significativa con el inhibidor de ERK1/2 (de 4.6 veces de incremento con UTP a 3.7 veces).

Por último, se estudió el estado de fosforilación del factor c-fos en presencia de UTP. Se trataron las células con 250  $\mu$ M de UTP durante diversos tiempos y se visualizó mediante Western blot e inmunocitoquímica su estado de fosforilación. Como puede observarse en la **Figura R17-E** se produjo una fosforilación de c-fos a los 5 y 30 minutos de incubación con UTP. Ésta se corroboró mediante inmunocitoquímica, tal y como puede observarse, las células control presentaron una menor presencia de la proteína c-fos fosforilada y un aumento en la señal perinuclear y en el núcleo después de 30 minutos con el tratamiento con n el nucleótido UTP.





**Figura R17. El UTP extracelular induce una sobre expresión de los factores de transcripción c-fos y c-jun a través de la activación de las MAPK. (A, B)** Las células RT4D6P2T se trataron con 250  $\mu$ M de UTP a distintos tiempos. Se cuantificaron mediante PCR a tiempo real los niveles de expresión de los factores de transcripción c-fos y c-jun, y como control los genes GAPDH y  $\beta$  tubulina. Los datos están representados como la media  $\pm$ SD de tres experimentos independientes respecto a sus controles (\*\* $p \leq 0.01$ ). **(C, D)** Las células se pre trataron durante 30 minutos con 10  $\mu$ M de los inhibidores selectivos de ERK1/2 y P38 y con 20  $\mu$ M del inhibidor de JNK. Se trataron con 250  $\mu$ M de UTP durante 1 hora y se cuantificó mediante PCR a tiempo real la expresión de los genes de c-fos o c-jun y como controles GAPDH y  $\beta$  tubulina. Los resultados muestran la media  $\pm$ SD de tres experimentos independientes respecto a sus controles (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.001$ ). **(E) El UTP induce una fosforilación del factor de transcripción c-fos.** Se trataron las células RT4D6P2T con 250  $\mu$ M de UTP a diferentes tiempos y los lisados fueron analizados mediante Western blot utilizando anticuerpos contra c-fos fosforilado y GAPDH. Se muestra un inmunoblot representativo de dos experimentos independientes. Se trataron las células con 250  $\mu$ M de UTP durante 30 minutos y se realizaron inmunocitoquímicas utilizando un anticuerpo contra c-fos fosforilado (en rojo) y tinción nuclear con Hoecsht (en azul). Se muestran tres fotos representativas para el grupo control y tres fotos representativas para el grupo tratado con UTP. Fotos realizadas a 100 aumentos.

## **IX. DISCUSIÓN**

## IX. DISCUSIÓN

*Dada la descripción e importancia reciente de los nucleótidos como moléculas de señalización extracelular y la mejoría presentada en pacientes con neuropatías periféricas después del tratamiento con CMPForte® (fármaco compuesto por CMP, UMP, UDP y UTP), nuestro grupo quiso hacer hincapié en cuáles eran sus efectos sobre las células de Schwann, una de las poblaciones celulares más importantes en cuanto a regeneración de daño en el nervio (Fenrich et al. 2004). El estudio de la implicación de estas células y de los nucleótidos en la regeneración axonal es pues de suma importancia, ya que pueden adquirir un papel relevante en la protección y regeneración de desórdenes nerviosos periféricos. Está descrito que la glía periférica es capaz de transformar su fenotipo mielinizante a un estado no-mielinizante en el cual expresa diversos factores neurotróficos, receptores de neurotrofinas como P75, varias integrinas que se unen a la matriz extracelular y diversas moléculas de adhesión (Martini et al. 1998, Balice-Gordon et al. 1998, Fu et al. 1997, Gschwendtner et al. 2003).*

*A pesar de que existen muchos estudios en cuanto a la señalización de nucleótidos (sobre todo ATP) en células gliales del SNC (Tozaki-Saitoh et al. 2011, Koles et al. 2011, Quintas et al. 2011), poco es sabido sobre la implicación del ATP, UTP y análogos de éstos en células gliales del SNP. En este trabajo hemos profundizado en los efectos causados por los nucleótidos (UMP, UDP, UTP y CMP) en células de Schwann a nivel proteómico y en concreto en la regulación por parte del UTP sobre la expresión de N cadherina.*

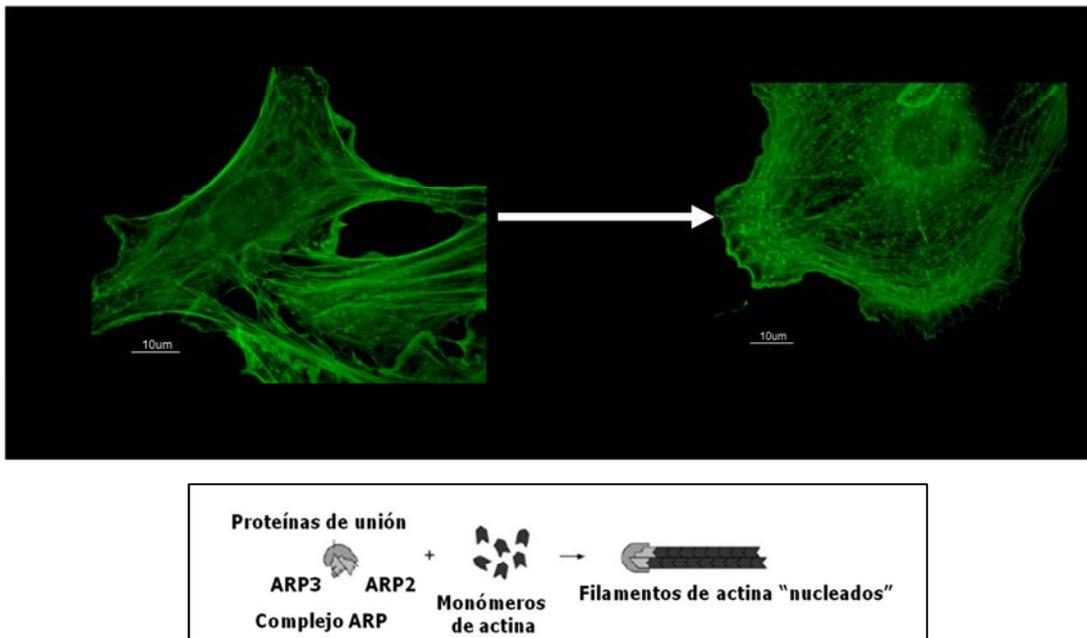
**CAMBIOS PROTEICOS Y ESTRUCTURALES EN CÉLULAS DE SCHWANN EN PRESENCIA DE NUCLEÓTIDOS: CMP Forte® provoca una sobre regulación de proteínas implicadas en estrés reticular, transporte vesicular, organización de actina y traducción proteica**

Una gran red de señalizaciones entre las neuronas y las células de Schwann mantienen y controlan la estructuración en el SNP, así encontramos moléculas de gran importancia como la neuregulina u otros factores de crecimiento, pero poco es sabido sobre cuáles son los efectos de los nucleótidos como mensajeros extracelulares (Li et al. 1997). Trabajos realizados por Fields y Stevens (Fields et al. 2002) han descrito que los nucleótidos liberados por parte de los axones como el ATP representan uno de los mecanismos principales de comunicación entre los axones y la glía mielinizante. Además, es sabido que las células de Schwann tienen una gran relevancia en cuanto a la regeneración del SNP (Sulaiman et al. 2000) y se ha descrito que la activación de receptores purinérgicos en axones y células de Schwann es vital en procesos regenerativos, ya que su inhibición conlleva a una incorrecta regeneración del nervio (Vrbova et al. 2009). En la glía del SNC los nucleótidos extracelulares son capaces de estimular la migración y la diferenciación promoviendo la mielinización de los axones (Agresti et al. 2005a, Agresti et al. 2005b) provocando además la aparición de cambios fenotípicos en ellos parecidos a astrogliosis y aumentos en proteínas tales como N cadherina (Neary et al. 2006, Tran et al. 2008b). Por otra parte, se ha descrito que las células de Schwann son capaces de responder a nucleótidos con una subida transitoria de calcio y que la activación de los receptores puede ser bloqueada en presencia del antagonista purinérgico suramina (Fields et al. 2002, Burnstock 2009b).

El estudio del papel de los receptores purinérgicos en las células de Schwann puede proporcionar información sobre su implicación en procesos regenerativos del nervio. Se conoce que los efectos mediados por los nucleótidos extracelulares son debidos a la activación de receptores ionotrópicos y metabotrópicos denominados P2X y P2Y respectivamente (Burnstock et al. 1985). La mayoría de receptores P2Y han sido localizados en el SNC y en el SNP en múltiples tipos celulares (Burnstock et al. 2004). En el momento de iniciar este trabajo existía poca información sobre los efectos a nivel proteico de los nucleótidos en células de Schwann. Uno de los principales componentes del fármaco CMP Forte es el UTP, uno de los nucleótidos trifosfato caracterizado como agonista selectivo de algunos receptores P2Y (Lazarowski et al. 2001). En un primer estudio se ha descrito la presencia de los receptores sensibles a uridina P2Y<sub>2</sub>, 4 y 6 en células de Schwann RT4D6P2T y en cultivos primarios de células de Schwann. El fármaco y el UTP por sí sólo provocan un aumento de calcio en el citoplasma, la cual cosa confirma la actividad de dichos receptores metabotrópicos ya que en presencia del antagonista no selectivo suramina se revierte dicho efecto. Algunos estudios recientes han descrito que la suramina puede llegar a actuar como un antagonista relativamente selectivo del receptor P2Y<sub>2</sub> (Nakamura et al. 2011, Kemp et al. 2004). Con nuestros datos obtenidos pero, no se puede concluir si la implicación de este receptor es la que está mediando los efectos encontrados. Aunque sí hemos observado mediante PCR a tiempo real que en células RT4D6P2T y en cultivos primarios hay una mayor expresión de receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>, por lo que la actividad de ambos podría ser importante en los cambios visualizados.

Utilizando la técnica cuantitativa de 2DE-DIGE se han visualizado 6 proteínas sobre reguladas en presencia del fármaco CMPF: *Protein Disulphide Isomerase* (PDI), *Actin Related Protein 3* (ARP3), *Rab GDP Dissociation Inhibitor* (RabGDI), *Elongation Factor 2* (EF2), *Triosephosphate Isomerase* (TIM), y Annexina 11. De todas las proteínas encontradas se ha confirmado el incremento mediante dos técnicas más de detección proteica (Western blot e inmunocitoquímica) escogiendo tres de las proteínas encontradas: PDI, ARP3 y RabGDI. Por otro lado, se ha demostrado un cambio fenotípico

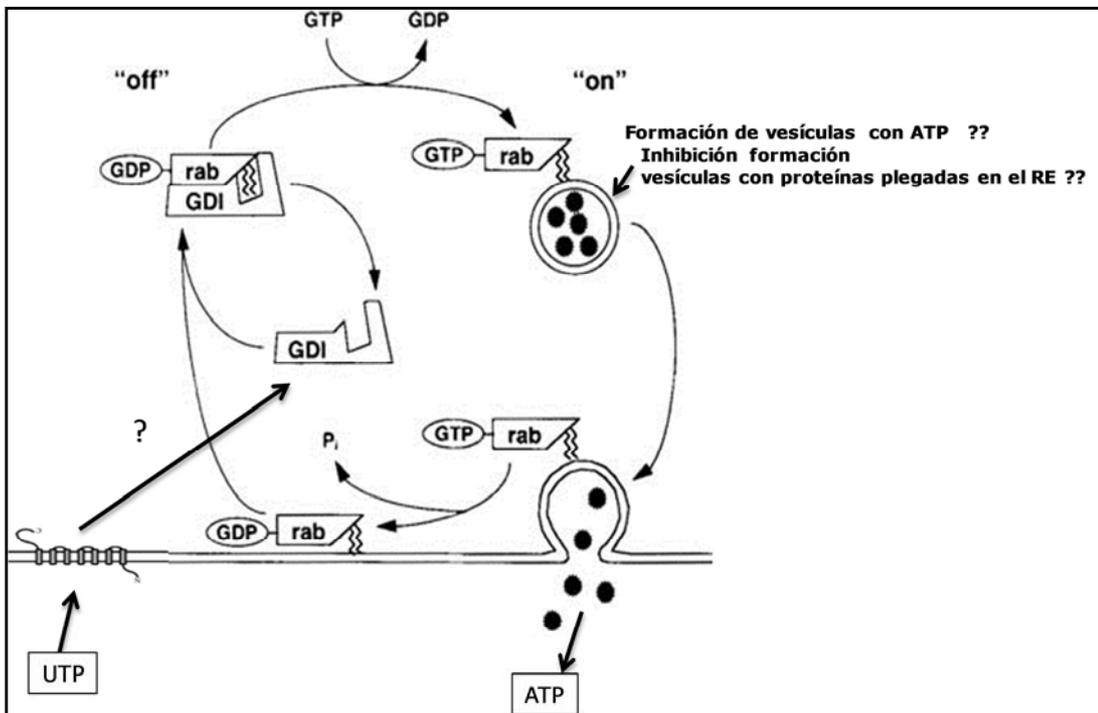
en las células de Schwann en presencia del fármaco y de UTP. Es sabido que muchas de las interacciones entre las células de Schwann y los axones conducen a una diferente reorganización de la actina y que una mala organización se traduce en una desestructuración y una incorrecta migración/mielinización (Fernandez-Valle et al. 1998). A su vez, la formación de lamellipodia es importante en las células que migran así como también en los conos de crecimiento de los axones (Machesky et al. 1997, Etienne-Manneville et al. 2002). Nuestros resultados confirman que a través de los receptores P2Y, el UTP es capaz de reorganizar el citoesqueleto de actina (**Figura D1**), incrementar los contactos intercelulares (ambos visualizados después de efectuar tinciones con phalloidina-FITC), y también aumentar la expresión de la proteína ARP3 (spot número 70), una de las proteínas nucleantes más importantes en la polimerización de los monómeros de actina G (actina libre o no polimerizada) a actina F (encargada de estructurar los microfilamentos) (Communi et al. 1997). Otra de las proteínas sobre reguladas en presencia de nucleótidos fue la *triosephosphate isomerase* (TIM) (spot 87) (Weiner et al. 2001); la cual es una enzima glicolítica y gluconeogénica involucrada en el crecimiento celular. El cambio fenotípico observado podría deberse a ambos procesos: una reestructuración de la actina y el crecimiento celular. La reorganización de la actina y los cambios morfológicos son trascendentales ya que en estudios recientes se ha demostrado que en procesos de daño nervioso las células de Schwann adquieren diversas morfologías y expanden procesos para favorecer la regeneración (Cheng et al. 2002); siendo dichos cambios fenotípicos esenciales para la migración y la correcta envoltura del axón (Barber et al. 2004, Norris et al. 2009).



**Figura D1.** Reorganización de la actina en células de Schwann RT4D6P2T en presencia de UTP. Inmunocitoquímica con Phalloidina-FITc (en verde) después de un tratamiento con 250 µM de UTP durante 5 horas. ARP3 es una de las proteínas nucleantes de la actina que junto la proteína ARP2 forman el complejo ARP.

Tal y como ha sido descrito en numerosos trabajos, los nucleótidos a través de los receptores P2Y provocan la activación de la proteína fosfolipasa C (PLC) la cual hidroliza el fosfatidil 4,5-bisfosfato a inositol 1, 4, 5- trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (Burnstock 2004), el IP3 es capaz de interactuar con los receptores IP3 del retículo endoplasmático y elevar la concentración intracelular de calcio. Esta elevada concentración de calcio intracelular puede participar en

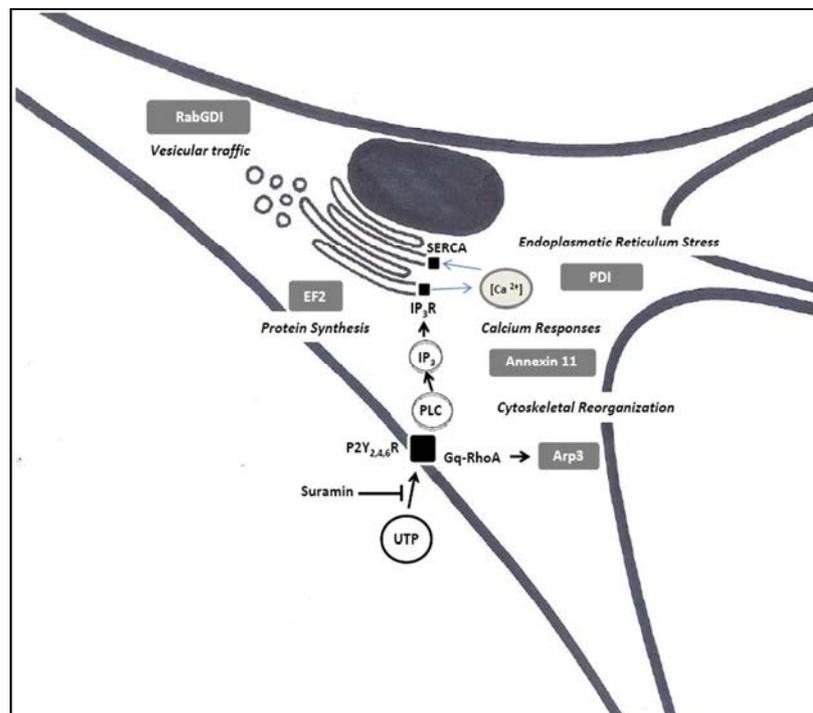
respuestas a través de annexinas las cuales se unen a los fosfolípidos cargados negativamente de una forma calcio-dependiente (Lecona et al. 2003). Así como se ha descrito para la annexina 1, la annexina 11 puede estar regulada por esta salida de calcio intracelular (Farnaes et al. 2003, Monastyrskaya et al. 2009, Hayes et al. 2004). Estas proteínas han sido descritas además como reguladoras de múltiples procesos tales como transducción de señales, tráfico y agregación de vesículas y organización de membranas. En nuestro estudio, no sólo esta proteína relacionada con transporte vesicular se ha visto alterada; si no que RabGDI (spot 71) también. Ésta es expresada en tejidos sensoriales y sistema nervioso y regula el intercambio GDP-GTP de la familia Rab, proteínas G de la superfamilia ras que a su vez regulan el transporte vesicular entre orgánulos. Recientemente, se ha descrito que el tratamiento con UTP es capaz de provocar una liberación de ATP en células de Schwann dependiente en gran parte del transporte vesicular por lo que algún proceso similar podría estar ocurriendo en nuestro modelo de estudio (**Figura D2**) (Liu et al. 2005). Además de todas las funciones anteriormente comentadas por parte de las annexinas, éstas también son capaces a su vez de interactuar con componentes del citoesqueleto como la F-actina (relacionado como se ha dicho anteriormente con Arp3, spot 70) u otras proteínas que median interacciones entre la célula y la matriz extracelular (Hayes et al. 2004, Gerke et al. 2002).



**Figura D2.** Hipótesis sobre la implicación en transporte vesicular en células de Schwann por parte del UTP extracelular. Estudios recientes postulan que el UTP en células de Schwann provoca una salida de ATP de forma PKC dependiente. Rab GDI está involucrada en el transporte vesicular, ya que regula la unión GDP-GTP de las proteínas Rab involucradas en esta liberación mediante exocitosis. La presencia de esta proteína después de nuestro tratamiento podría revelar una posible liberación de ATP en el espacio extracelular y/o una implicación en el transporte proteico en el retículo endoplasmático; ya que podría estar inhibiendo el transporte vesicular evitando así la salida de proteínas mal plegadas resultantes de la presencia de estrés en el retículo (Véase explicación sobre PDI, "spot" 72).

Los cambios en la concentración intracelular de calcio pueden controlar también otras respuestas intracelulares como la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la proliferación celular y

excitabilidad celular (Dolmetsch et al. 1998, Berridge et al. 1998, Buchholz et al. 2007). Una de las proteínas involucradas en estrés del retículo endoplasmático es la enzima *protein disulphide isomerase* (PDI, spot 60). PDI es una de las proteínas mayoritarias del retículo endoplasmático que tiene múltiples funciones dentro las que destacamos la rotura y la formación de puentes disulfuro de las proteínas (Primm et al. 1996). Además se ha descrito recientemente que PDI debido a su interacción con el canal SERCA 2b, controla la homeostasis del calcio intracelular (Li et al. 2004). Este control ayudaría a establecer de nuevo las concentraciones intracelulares de calcio. Las condiciones estresantes del retículo endoplasmático provoca que se inicie la denominada *unfolded protein response* (UPR) para restablecer la función normal del retículo endoplasmático. La UPR reduce la acumulación de proteínas mal plegadas inhibiendo la síntesis proteica y removiendo las proteínas mal plegadas del retículo translocándolas al citoplasma y siendo degradadas por el proteasoma (Hoyer-Hansen et al. 2007, Lai et al. 2007, Wu et al. 2002, Demeshkina et al. 2007). En la iniciación de la respuesta UPR se han visto implicadas las proteínas PERK y EF2 (*spots* 81 y 93) (Ryazanov et al. 1990). En el caso de EF2, no sólo se ha encontrado un *spot*, si no que dos de ellos coinciden en la detección de la misma proteína, por lo que ésta podría haber sido modificada post-traduccionamente presentando por ejemplo glicosilaciones o fosforilaciones. El complejo formado por EF2 es de gran importancia en la iniciación de la síntesis proteica, ya que recluta los tRNA a los ribosomas para iniciar la traducción (Buss et al. 1994). La fosforilación de la proteína EF2 inhibe su actividad y reduce la síntesis proteica. El papel principal que tiene la fosforilación de esta proteína es la inhibición generalizada de la traducción proteica cuando existen estreses como la salida hacia el citoplasma de calcio intracelular desde los reservorios del retículo endoplasmático (Buss et al. 1994, Buss et al. 1994).



**Figura D3.** Modelo propuesto sobre los efectos del fármaco CMPF en células de Schwann RT4. En recuadros de color gris se encuentran las proteínas sobre reguladas en presencia de nucleótidos. El inhibidor suramina bloqueó la sobre regulación y la salida de calcio de los reservorios del RE.

En resumen, podemos decir que en este primer trabajo hemos observado los efectos del fármaco CMP Forte a nivel proteico sobre las células de Schwann RT4D6P2T mediante la utilización de la técnica 2DE-DIGE en combinación con espectrometría de masas. Se ha observado que los efectos mediados por este fármaco son debidos en su totalidad a la presencia del nucleótido UTP; que nuestro modelo de estudio expresa los receptores P2Y<sub>2</sub>, 4 y 6 y que estos son activos en presencia de agonistas. Se ha demostrado además la sobre regulación de 6 proteínas y la alteración de la morfología/estructuración de la actina en células de Schwann.

Estos resultados aportan información sobre cuáles son los mecanismos activados en estas células gliales tanto a nivel fisiológico como en daño axonal en presencia de nucleótidos extracelulares, y pueden aportar nuevos progresos en las terapias actuales.

## 2. LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN N CADHERINA ES REGULADA POR EL UTP EXTRACELULAR EN CÉLULAS DE SCHWANN

En el SNP las neuronas y las células de Schwann expresan ambos receptores purinérgicos y su activación provoca una salida de calcio intracelular y la activación de múltiples cascadas de señalización de entre las cuales se han encontrado diversas MAPK involucradas (Anselin et al. 1997, Berti-Mattera et al. 1996b, Verkhratsky et al. 2009). Se ha descrito que el ATP es capaz de activar ambos receptores P2X y P2Y; en contra, el UTP, el nucleótido usado en este estudio, sólo ha sido descrito como agonista de los receptores P2Y (P2Y<sub>2</sub>, 4 y 6). La concentración intracelular de estos nucleótidos trifosfato suele ser de entre 2 y 5 mM. En relación a su secreción esta transcurre o bien cuando se produce daño en la membrana por ejemplo por presencia de necrosis o de forma fisiológica, ya que se han descrito diversos tipos celulares capaces de liberar nucleótidos de forma controlada (Harden et al. 1997, Harden et al. 1999, Gerasimovskaya et al. 2002). El UTP no se degrada tan fácilmente por presencia de ectonucleotidasas externas como el ATP (Lazarowski et al. 2001) por lo que su efectividad es más elevada en cuanto a efectos autocrinos o paracrinos con células circundantes. Creemos que las respuestas inducidas en las células de Schwann mediadas por la activación de receptores P2Y por UTP podrían facilitar la expresión de moléculas significativamente importantes en la regeneración axonal.

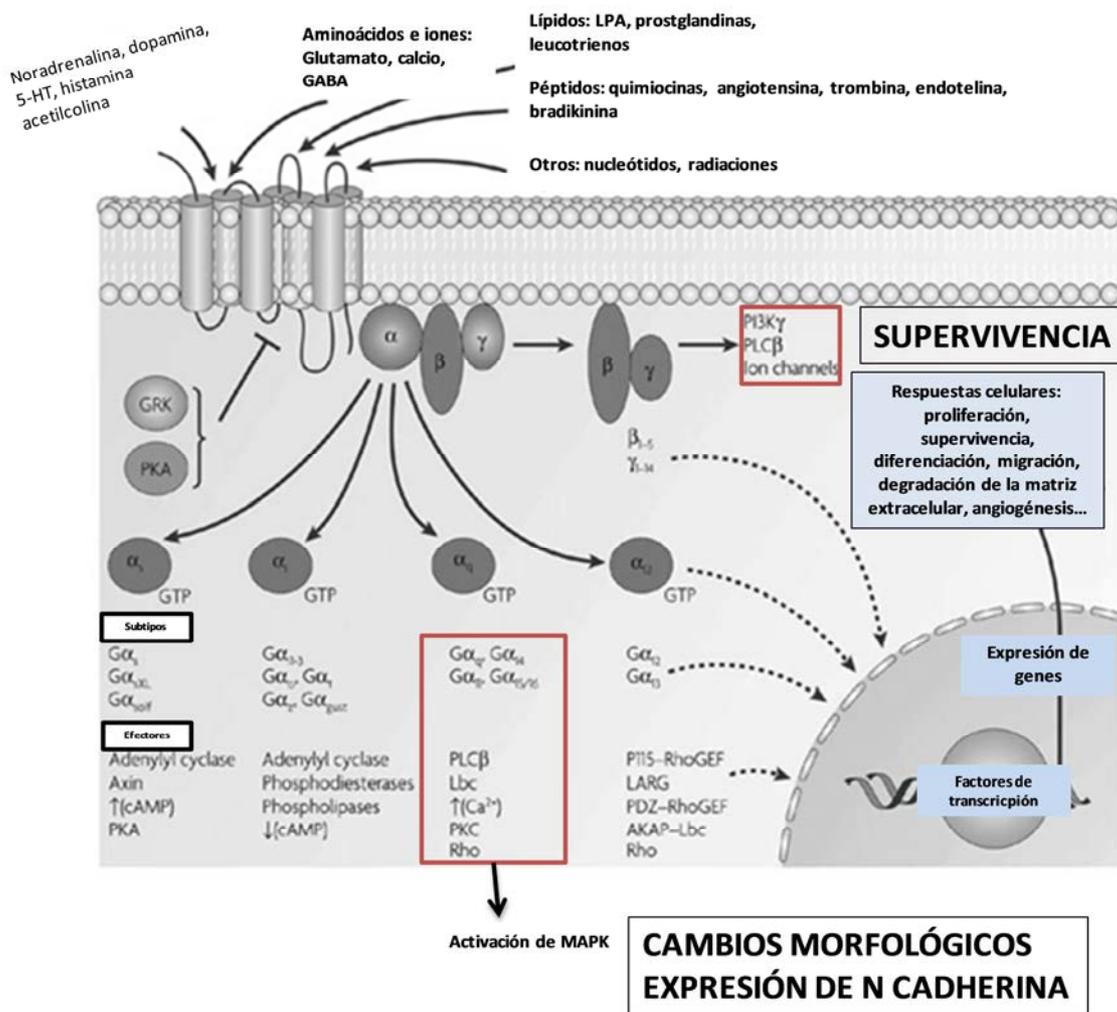
Es sabido que la expresión de moléculas de adhesión como la N cadherina en los axones y en las células de Schwann (Wanner et al. 2002, Letourneau et al. 1991) y moléculas de la matriz como la laminina (Milner et al. 1997) tienen papeles importantes en la migración, diferenciación y mielinización en el SNP. Estas interacciones median reorganizaciones de actina las cuales son de gran importancia en los procesos de mielinización/desmielinización (Fernandez-Valle et al. 1998). A pesar de ello, pocos son los datos que indican si la activación conducida por nucleótidos a través de receptores P2Y conduce a una modificación en la expresión de alguna de estas moléculas en las células de Schwann. Recientemente, se ha descrito que la activación de los receptores P2Y está relacionada con la regulación de moléculas de adhesión tales como VCAM o N cadherina (Seye et al. 2004, Tran et al. 2008b, Vanderstocken et al. 2010). Por otro lado, en células de Schwann es sabido que la estimulación de receptores con LPA o neuregulina/heredulina provoca la expresión de N cadherina a través de la participación de diversas MAPK (Wanner et al. 2006a). La proteína de adhesión N cadherina es una molécula muy importante en el crecimiento de neuritas y en procesos de reorganización sináptica (Neugebauer et al. 1988, Benson et al. 1998, Kiryushko et al. 2004, Hansen et al. 2008). Además, Wanner and Wood describieron en el 2002 que la proteína de adhesión N cadherina es fundamental en los contactos intercelulares entre células de Schwann y en los procesos de alineación entre las células de Schwann y los axones (Wanner et al. 2002). No sólo eso, si no que su expresión en el SNP se encuentra delimitada en las células precursoras de Schwann, siendo un sustrato favorable para el correcto crecimiento axonal (Wanner et al. 2006a).

En este segundo estudio abordado hemos analizado los efectos del UTP en la expresión tanto a nivel de mRNA como de proteína de la molécula de adhesión N cadherina. Observamos un aumento en la expresión de proteína relacionada con la actividad P2Y de forma dosis y tiempo dependiente. Sorprendentemente los niveles de mRNA de N cadherina alcanzan los niveles máximos una hora después del tratamiento mientras que a nivel proteico aparecía un aumento transcurridas 24 horas. En diversos trabajos se ha descrito que los niveles de mRNA no se correlacionan directamente con la expresión proteica debido a regulaciones postranscripcionales (Fournier et al. 2010). Descartamos posibles implicaciones del UTP con la longevidad de la vida media de N cadherina con diversos

tratamientos con el inhibidor de traducción proteica cicloheximida, pero no obtuvimos ningún resultado concluyente (*datos no mostrados*), por lo que este retraso en la expresión puede tener relación con la estabilidad del mRNA o con procesos postranscripcionales.

En resultados anteriores describimos que la presencia de nucleótidos extracelulares en células de Schwann provoca un cambio en la estructuración de la actina y aparecen conexiones intercelulares. En este estudio demostramos que no sólo la expresión de N cadherina se encuentra incrementada si no que ésta se relocaliza al espacio citoplasmático y aumenta en los contactos celulares.

Existe pues una clara correlación entre la actividad de los receptores P2Y y la expresión de N cadherina. Para descartar cuáles son las cascadas de señalización que mediaban dicha expresión se ha estudiado en primer lugar cuáles eran las vías activadas en nuestro modelo en presencia de UTP. Las cascadas de señalización activadas por presencia de nucleótidos extracelulares implican mayoritariamente la activación de la PLC, la salida de calcio, y la activación de quinasas tales como PKC, AKT y MAPK. Observamos que la presencia de UTP provoca la fosforilación a tiempos cortos de la proteína quinasa ERK 1/2 y de dos proteínas quinasas relacionadas con estrés celular: JNK y P38, sugiriendo que el UTP a estas concentraciones está actuando también como un "estrés" para la célula. Las tres quinasas (todas pertenecientes a la familia de las MAPK) están involucradas en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Cargnello et al. 2011, Communi et al. 2000). No encontramos aumentos en la proliferación de las células de Schwann en presencia de UTP (*datos no mostrados*). Estudios anteriores habían correlacionado directamente el efecto de los nucleótidos extracelulares con un aumento en la proliferación, actuando pues como factores tróficos (Neary et al. 2006, Nakamura et al. 2011) o también en procesos de diferenciación en células neuronales (Halfar et al. 2001). A pesar de ello es sabido que la continua activación de la vía Ras/Raf/ERK en las células de Schwann las lleva a adquirir un fenotipo des diferenciado y las mantiene en estado quiescente (Harrisingh et al. 2004, Ridley et al. 1988). No sólo se ha visto implicada la quinasa ERK en procesos de des diferenciación si no que la quinasa P38 (a pesar de tener papeles importantes en procesos de mielinización) también ha sido descrita como supresora de la mielinización (Fragoso et al. 2003). Por otro lado, c-jun, un factor de transcripción regulado mayoritariamente por la quinasa JNK, ha sido descrito como factor promotor de la des diferenciación de las células de Schwann actuando de forma antagónica al factor de transcripción Krox20. La activación de estas tres quinasas en nuestro modelo y el no aumento de proliferación de las mismas indican que las células de Schwann entran en estadios de des diferenciación en presencia del nucleótido UTP. La activación de estas MAPK se inhibe completamente inhibida por inhibidores selectivos de la vía P2Y revelando que la actividad de PLC, Rho quinasa y PKC son esenciales en su activación.



**Figura D4.** Los nucleótidos extracelulares en las células de Schwann actúan como moléculas de señalización a través de los receptores metabotrópicos de tipo P2Y. La interacción del UTP con el receptor provoca señalizaciones a través de proteínas *Gaq* y de las subunidades  $\beta\gamma$  que desencadenan en la activación de MAPK y de PI3K. La cascada de las MAPK finaliza en nuestro modelo con la regulación de la proteína N cadherina. Los resultados con inhibidores selectivos para cada una de ellas nos han desvelado una posible relación cruzada entre P38 y ERK1/2. Su activación depende de la activación de ROCK, (por lo que proteínas pequeñas G de subtipo Gq estarían mediando dicha activación), de la activación de fosfolipasa C y de PKC. Estas señalizaciones serían a tiempos cortos. Como se postula en un [review](#) sobre *Crosstalk and specificity in signaling: Are we crosstalking ourselves into general confusion?*

En este trabajo, se han utilizado inhibidores específicos para cada una de las MAPK pero en nuestro modelo observamos que el inhibidor de MEK inhibía también la fosforilación de P38 y de JNK y que existe una pequeña relación cruzada entre P38 y JNK con SB. Estos resultados no nos permiten descartar la implicación de una sola quinasa en la expresión de N cadherina ya que los tres inhiben su expresión tanto a nivel proteico como a nivel de mRNA. Por otro lado, AKT también es activada de forma constante con UTP pero la inhibición de su activación en presencia del inhibidor de PI3K *Wortmannin* no provocaba una disminución de la expresión de N cadherina (*datos no mostrados*). Por otro lado está descrito que esta vía mediada por la serina treonina quinasa AKT (PKB) inhibe

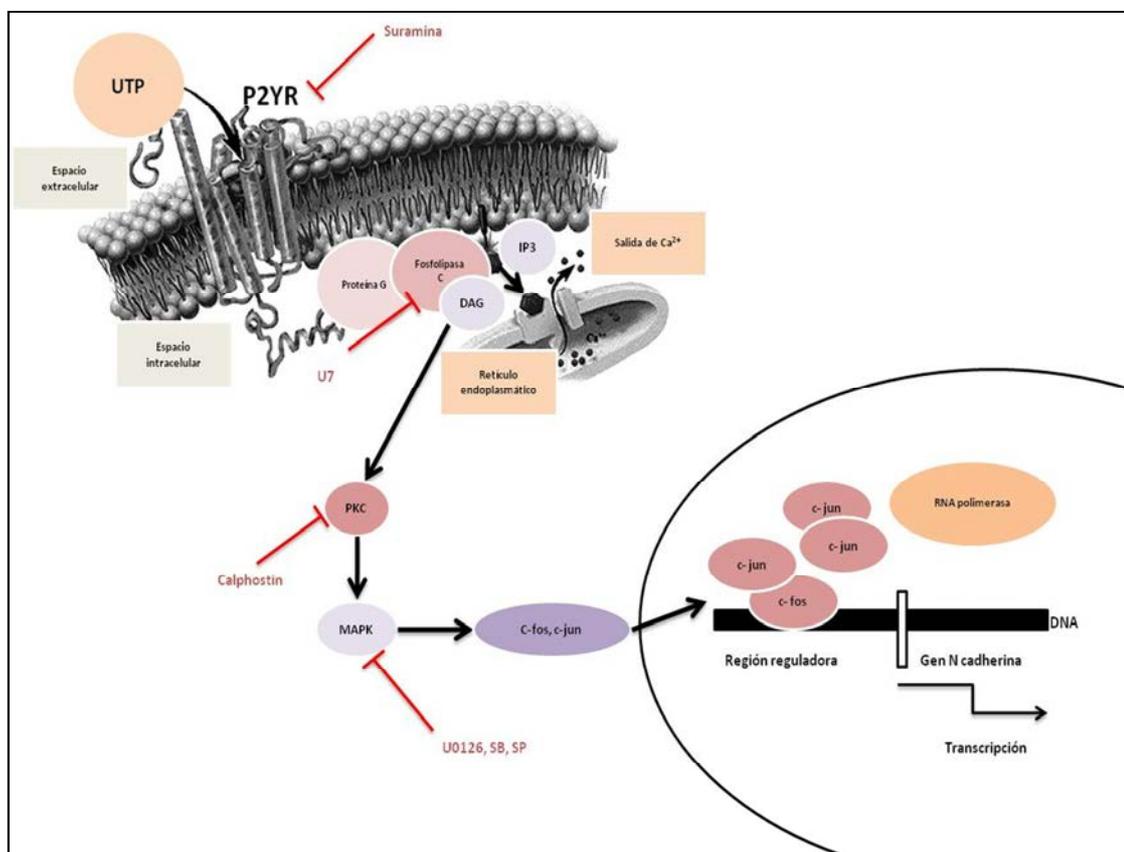
mayoritariamente procesos apoptóticos, inhibiendo por ejemplo proteínas pro apoptóticas tales como BAD o activando factores de transcripción de supervivencia como NFK $\beta$ . No sólo eso si no que su activación también se ha relacionado en arrestos de ciclo de G1 a G2 (Ogata et al. 2004, Yang et al. 2004, Franke et al. 2009). Su activación constante en presencia de UTP podría estar mediando respuestas de supervivencia. Ogata et al han descrito que el balance de activación mediada por las vías PI3K-Akt/ERK es crucial en el proceso de mielinización, ya que la primera la favorece y la segunda provoca una desdiferenciación de la célula (Ogata et al. 2004).

Es sabido que la activación de las cascadas de señalización de las MAPK promueve la expresión de genes a través de la activación/fosforilación de diversos factores de transcripción. Algunos trabajos evidencian que la activación de receptores P2Y conlleva la expresión de genes tempranos en células de la microglía (Priller et al. 1995). Además, Bolego y colaboradores describieron en 1997 la acumulación de las proteínas c-fos y c-jun en el núcleo en astrocitos en presencia de nucleótidos (Priller et al. 1995). En un estudio *in silico* realizado por Le Mee (Le Mee et al. 2005a) se ha descrito que en el promotor humano de la N cadherina existen varios lugares de unión de factores tales como Mz-1 y lugares de unión AP1. AP1 (*activating protein 1*) es un complejo dimérico cuyos componentes son las proteínas protooncogénicas c-Jun y c-Fos. Este complejo consiste en homodímeros de proteína c-Jun o heterodímeros de c-Jun y c-Fos que se unen a lugares reguladores en el DNA (elementos de respuesta *tetradecanoylphorbol acetate responsive elements* (TRE) o AP-1 *binding sites*) (Lu et al. 2002). Factores como la radiación, el estrés oxidativo, las citoquinas, los factores de crecimiento e infecciones virales han sido descritos como estimuladores de su activación (Shaulian et al. 2001). No sólo el incremento de los factores de transcripción es importante sino también el estado de su fosforilación. Por ejemplo, los factores de crecimiento pueden activar AP1 principalmente a través de la vía de la ERK quinasa. Esto induce a la expresión y fosforilación de genes c-fos que pueden heterodimerizar con las proteínas c-Jun y aumentar la actividad AP1 (Angel et al. 1988). No sólo ERK 1/2 se ha visto implicada en su expresión, las proteína quinasa JNK y P38 también pueden regular la expresión y fosforilación de dichos factores. (Whitmarsh et al. 1996, Tanos et al. 2005, Karin 1996).

Brambilla y colaboradores demostraron que la presencia de nucleótidos en astrocitos incrementaba la unión al DNA de factores AP1 y que esta unión aumentaba considerablemente entre 30 minutos y 1 hora después del tratamiento correlacionándose con la activación de ERK quinasa (activación a los 10 minutos) (Brambilla et al. 2002). Estas observaciones resultan interesantes ya que se han obtenido resultados parecidos en nuestro estudio donde se ha demostrado que el tratamiento con UTP provoca en las células de Schwann un incremento de dichos factores de transcripción (c-jun y c-fos) a los 30 y 60 minutos de tratamiento, justo después de la activación de MAPK. La inhibición de las tres MAPK induce una disminución en su expresión, por lo que la vía de señalización de las MAPK media la activación de dichos factores de transcripción en las células de Schwann. Sorprendentemente, se ha encontrado una correlación temporal entre la expresión de estos factores de transcripción y el aumento de mRNA y de la proteína N cadherina. Diversos trabajos han descrito que el estado de mielinización y diferenciación de las células de Schwann se relaciona con la ausencia o presencia de diversos factores de transcripción; así se han clasificado como factores de transcripción favorecedores de la mielinización Krox-20, OCT-6, SOX 10, BRN 2 y NFK $\beta$  y como reguladores negativos c-jun, NOTCH, SOX 2, PAX 3 e Id2 (Jessen et al. 2008a, Parkinson et al. 2004, Woodhoo et al. 2009, Parkinson et al. 2008). Estos últimos se han visto expresados tanto en estadios tempranos de la formación del SNP como en períodos de daño nervioso. Algunos trabajos recientes describen el efecto antagónico entre Krox-20 y c-jun confirmando este último como un factor de des diferenciación (Parkinson et al. 2008, Jessen et al. 2008b, Nagarajan et al. 2001). La

sobre regulación del factor c-jun en nuestro modelo podría explicar una posible des diferenciación celular en presencia de nucleótidos de uridina. Los sitios de unión AP-1 son importantes en la sobre expresión del gen de N cadherina mediada por UTP como se ha observado mediante estudios del promotor humano de N cadherina. Por lo tanto, existe una correlación entre la expresión de los genes c-fos y c-jun y la expresión de N cadherina en presencia del nucleótido UTP.

En este segundo trabajo se ha descrito que el UTP extracelular en las células de Schwann provoca una sobre regulación del mRNA y de la proteína de adhesión N cadherina, además de una diferente localización de esta, sugiriendo que las cascadas de señalización mediadas por la activación de receptores P2Y están involucrados en la expresión y localización de dicha proteína. La vía activada, sumariada en la figura tal nos indica que los nucleótidos podrían estar actuando como moléculas señalizadoras de "estrés" que inducirían a las células de Schwann un fenotipo des diferenciado en el cual se estarían regulando moléculas de adhesión como N cadherina la cual es de gran importancia en los contactos entre células de Schwann y entre células de Schwann y axones promoviendo procesos de reparación.



**Figura D5.** Regulación de la proteína N cadherina por parte de UTP. La interacción del UTP con receptores de membrana P2Y provoca una activación de cascadas intracelulares donde encontramos activación de la fosfolipasa C (PLC), hidrolización del IP2 a IP3 y DAG, activación de PKC y MAPK que se traduce a un aumento de los factores de transcripción c-fos y c-jun. Esta sobre regulación de ambos genes tempranos provoca la sobreexpresión de promotores que contienen zonas de unión AP-1, como es el caso del gen de N cadherina. La aplicación de diversos inhibidores de proteínas implicadas en la vía, tales como la suramina (inhibidor de receptores P2Y), como de fosfolipasa C (U7), como de PKC (calphostina), como de tres de las MAPK (U0126, SB y SP) provocan una baja regulación de c-fos y cjun y la consecuente inhibición de la expresión de la proteína N cadherina.





## **X. CONCLUSIONES**



## X. CONCLUSIONES

- ✚ La línea celular RT4D6P2T y las células de Schwann procedentes de ratas neonatales expresan los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y<sub>2</sub>, 4 y 6, siendo mayoritaria la expresión de P2Y<sub>2</sub> y 4.
- ✚ Los receptores purinérgicos de la línea RT4D6P2T son funcionales ya que existe liberación de Ca<sup>2+</sup> en presencia del nucleótido UTP o del fármaco CMP Forte®.
- ✚ El tratamiento de las células RT4D6P2T con CMP Forte® provoca una sobre regulación de 6 proteínas involucradas en procesos tales como la reorganización de la actina, el estrés del retículo endoplasmático y el transporte vesicular.
- ✚ El nucleótido causante de los efectos del fármaco CMP Forte® en las células de Schwann es el UTP ya que la sobreexpresión proteica es revertida en presencia del antagonista suramina.
- ✚ El tratamiento de las células RT4D6P2T provoca una reestructuración del citoesqueleto de actina y cambios morfológicos en las células de Schwann dependientes de la actividad de receptores purinérgicos. Además incrementa el número de contactos intercelulares.
- ✚ El UTP extracelular provoca un aumento de los contactos y de la adhesión intercelular dependiente de Ca<sup>2+</sup>. La activación purinérgica aumenta la expresión de mRNA y de proteína de N cadherina a través de la activación de tres MAPK: ERK1/2, P38 y JNK.
- ✚ El UTP extracelular aumenta la expresión y fosforilación de genes tempranos tales como c-fos y c-jun. La actividad del promotor de N cadherina mediada por el UTP depende de la presencia de lugares de unión AP-1.

En resumen, los efectos a nivel proteico del fármaco CMP Forte sobre las células mielinizantes del SNP radican en la presencia del UTP en su composición. Éste provoca cambios morfológicos en las células de Schwann y un aumento de contactos intercelulares dependientes de la proteína de adhesión N cadherina. La regulación de N cadherina por parte de la señal purinérgica depende de la activación de varias MAPK y de la expresión de los genes tempranos c-fos y c-jun.



## **XI. ÍNDICE DE FIGURAS**



## FIGURAS INTRODUCCIÓN

**Figura 1.** Tipos más frecuentes de glía del sistema nervioso. (Pág. 27)

**Figura 2.** Las fases del desarrollo en las células de Schwann. (Pág. 28)

**Figura 3.** Representación esquemática de la mielinización por parte de los oligodendrocitos en el SNC y de las células de Schwann en el SNP. (Pág. 28)

**Figura 4.** Características fenotípicas en la transición desde las células de la cresta neural hacia células precursoras de Schwann (SCPs) y células inmaduras de Schwann. (Pág. 29)

**Figura 5.** Cambios en la expresión molecular de la célula inmadura de Schwann a células madura mielinizante o no mielinizante. (Pág. 30)

**Figura 6.** Neurona mielinizada por células de Schwann. (Pág. 32)

**Figura 7.** Esquema de la estructuración de la vaina de mielina. (Pág. 32)

**Figura 8.** Factores de transcripción involucrados en la mielinización y en la desdiferenciación de las células de Schwann. (Pág. 33)

**Figura 9.** Familias de moléculas implicadas en adhesión celular. (Pág.34)

**Figura 10.** Representación de las diversas familias de cadherinas. (Pág. 35)

**Figura 11.** Representación esquemática de una cadherina clásica dependiente de calcio. (Pág. 36)

**Figura 12.** Proceso de regeneración de una fibra nerviosa periférica. (Pág. 38)

**Figura 13.** Esquema de las vías eferentes motoras y las vías aferentes sensitivas. (Pág. 40)

**Figura 14.** Componentes del fármaco CMP Forte<sup>®</sup>. (Pág. 44)

**Figura 15.** Familia de receptores purinérgicos clasificados según la sensibilidad a nucleótidos.  
(Pág. 45)

**Figura 16.** Familias de canales iónicos según su topología. (Pág. 46)

**Figura 17.** Representación esquemática de un receptor P2X. (Pág.47)

**Figura 18.** Agonistas y antagonistas más ampliamente descritos para los receptores P2X. (Pág. 48)

**Figura 19.** Representación esquemática de un receptor P2Y. (Pág. 49)

**Figura 20.** Árbol filogenético para los diferentes tipos de receptores P2X y P2Y. (Pág. 49)

**Figura 21.** Agonistas y antagonistas más ampliamente descritos para los receptores P2Y. (Pág. 51)

**Figura 22.** Esquema de las vías activadas por la interacción de agonistas con receptores P2Y. (Pág. 53)

**Figura 23.** Cascadas de señalización de las Mitogenic Activated Protein Kinases (MAPK). (Pág. 54)

**Figura 24.** Principales receptores P2Y sensibles a nucleótidos de uridina. (Pág. 56)

**Tabla 1.** Fármacos diseñados según la vía metabólica celular alterada por la alta presencia de glucosa en sangre. (Pág. 42)

**Tabla 2.** Resumen de las afecciones más frecuentes en el SNP. (Pág. 43)

**Tabla 3.** Receptores P2Y. (Pág. 50)

**Tabla 4.** Principales efectores para cada uno de los receptores P2Y. (Pág. 52)

## FIGURAS MATERIALES Y MÉTODOS

**Figura M1.** Línea celular RT4D6P2T. (Pág. 61)

**Figura M2.** Esquema de la obtención del cultivo primario de células de Schwann. (Pág. 63)

**Figura M3.** Cultivo primario de células de Schwann. (Pág. 63)

**Figura M4.** Diseño experimental para el análisis 2DE-DIGE. (Pág. 69)

**Figura M5.** Vector pGL3-basic utilizado. (Pág. 72)

**Tabla M1.** Densidades celulares utilizadas para cada uno de las técnicas utilizadas. (Pág. 64)

**Tabla M2.** Reactivos y material de Western blot. (Pág. 66)

**Tabla M3.** Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados. (Pág. 68)

**Tabla M4.** Diseño del marcaje de las muestras con los fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2. (Pág. 70)

**Tabla M5.** Listado de cebadores utilizados. (Pág.75)

## FIGURAS RESULTADOS

**Figura R1.** Cálculo de la viabilidad celular en la línea RT4D6P2T en presencia del fármaco CMP Forte y de los nucleótidos UMP, UDP, UTP y CMP. (Pág. 82)

**Figura R2.** Expresión de receptores sensibles a nucleótidos de uridina en células de Schwann. (Pág. 83)

**Figura R3.** Funcionalidad de los receptores P2Y. (Pág. 85)

**Figura R4.** Proteínas sobre reguladas en las células RT4D6P2T en presencia de CMPF. (Pág.86)

**Figura R5.** Validación de los resultados de 2DE-DIGE mediante Western blot e inmunocitoquímica. (Pág. 88)

**Figura R6.** La sobre regulación proteica y la reorganización citoplasmática son debidas a la activación de los receptores P2Y. (Pág.90)

**Figura R7.** El UTP extracelular incrementa la expresión de la proteína N cadherina y las uniones intercelulares en células de Schwann. (Pág. 94)

**Figura R8.** El UTP extracelular incrementa la expresión de la proteína N cadherina de forma dosis dependiente. (Pág. 95)

**Figura R9.** Los receptores purinérgicos median la sobre expresión de N cadherina por parte del UTP extracelular. (Pág. 97)

**Figura R10.** El UTP extracelular induce la activación de MAPK y AKT en células de Schwann. (Pág. 98)

**Figura R11.** La actividad de las MAPK induce la sobre expresión de los niveles de mRNA y de proteína de N cadherina mediada por UTP. (Pág. 99)

**Figura R12.** Visualización de la selectividad de los inhibidores de las MAPK o posible activación cruzada entre ellas en presencia de UTP. (Pág. 101)

**Figura R13.** Inhibidores utilizados contra proteínas involucradas en la respuesta de receptores P2Y en presencia de UTP. (Pág. 102)

**Figura R14.** La vía purinérgica induce la fosforilación y activación de las MAPK en células de Schwann. (Pág. 103)

**Figura R15.** Lugares de unión de los factores de transcripción y deleciones generadas para la secuencia del promotor de N cadherina humano. (Pág. 104)

**Figura R16.** Identificación de la región mínima requerida para la actividad basal del promotor humano de N cadherina en células de Schwann. Importancia de los lugares de unión AP-1 en la regulación del promotor de N cadherina por el nucleótido UTP extracelular. (Pág.106)

**Figura R17.** El UTP extracelular induce una sobre expresión de los factores de transcripción c-fos y c-jun a través de la activación de las MAPK. (Pág.108)

## FIGURAS DISCUSIÓN

**Figura D1.** Reorganización de la actina en células de Schwann RT4D6P2T en presencia de UTP. (Pág. 112)

**Figura D2.** Hipótesis sobre la implicación en transporte vesicular en células de Schwann por parte del UTP extracelular. (Pág. 113)

**Figura D3.** Modelo propuesto sobre los efectos del fármaco CMPF en células de Schwann RT4D6P2T. (Pág. 114)

**Figura D4.** Los nucleótidos extracelulares en las células de Schwann actúan como moléculas de señalización a través de los receptores metabotrópicos de tipo P2Y. (Pág. 118)

**Figura D5.** Regulación de la proteína N cadherina por parte del UTP. (**Pág. 120**)

## **XII. ANNEXOS**



**ARTÍCULO 1.**

*"UTP affects the schwannoma cell line proteome through  
P2Y receptors leading to cytoskeletal reorganization".*

*Tània Martíàñez, Montserrat Carrascal, Aloi Lamarca, Mònica Segura, Núria Durany, Roser Masgrau,  
Joaquín Abian, Alejandro Gella.*

*Proteomics ()*



**MANUSCRITO en preparación.**

*"N cadherin is regulated by extracellular UTP in Schwann cells".*

*Tània Martiàñez, Aloi Lamarca, Mònica Segura, Núria Durany, Alejandro Gella, Núria Casals.*



# **N cadherin expression is regulated by extracellular UTP in Schwann cells**

<sup>1</sup>Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de Catalunya,  
Josep Trueta s/n, Sant Cugat del Vallès, E-08195, Spain.

\*Correspondence: <sup>1</sup>Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat Internacional de  
Catalunya, Josep Trueta s/n, Sant Cugat del Vallès, E-08195, Spain.

Email: [agella@csc.uic.es](mailto:agella@csc.uic.es)

## **Keywords:**

UTP / P2Y receptors / Schwann cells / N cadherin/ MAPK

## Abstract

Extracellular UTP and ATP have been described such as molecules able to activate purinergic receptors and exert short-term and long-term effects on several tissues.

Depending on the phenotype, the peripheral myelinating glia, Schwann cells (SCs), express calcium dependent adhesion molecules such as E cadherin in Schmidt-Lanterman incisures or N cadherin during the first contacts with axons before myelination. N cadherin is a calcium dependent cell adhesion glycoprotein involved in glia-glia and axon-glia interactions. In the nervous system, N cadherin has been involved in a number of key events that range from the control of axonal growth and guidance to synapse formation and to synaptic plasticity. Here we examined the effects of UTP on Schwannoma and primary SCs culture cells. When Schwannoma cell line and Schwann cells obtained from primary cultures of rat sciatic nerves were treated with UTP, N cadherin expression was increased in a dose and time manner. N cadherin which is visualized to perinuclear distribution, changes to cytoplasm and contacts after UTP treatment. The UTP-induced increase of N cadherin expression was blocked by Suramin treatment, revealing that P2Y receptor signalling pathway may be involved in that process. In addition, UTP treatment on these cells induces changes in the cytoplasmic calcium ratio and activation of three MAPK (ERK 1/2, P38 and JNK) which in turn are related to N cadherin mRNA and protein expression. The activation of the three MAPK was blocked by several upstream inhibitors of P2Y signalling cascade (Suramin, ROCK inhibitor Y, PLC inhibitor U7 and PKC inhibitor calphostin). Moreover, AP1 binding sites, related to c-jun and c-fos levels, are of such importance in UTP-induced N cadherin promoter. All together, these findings suggest a new role of UTP in Schwann cells on regulating N cadherin expression and cell-cell contact interactions raising some evidences that nucleotides could benefit SC-SC junctions and SC processes with axons.

## Introduction

Nucleotides (ATP and UTP), molecules once thought to be involved only in cell metabolism, have been described such as signalling molecules since Burnstock in 1972 confirmed the neurotransmitter hypothesis raised several years before. They can be released upon physiological state or after trauma and mediate not only short term effects but also long term effects such as differentiation, neurite outgrowth, survival and cell death (Burnstock 2007,2008).The mechanism by which extracellular UTP interacts with cells came by the description of only uridine-sensitive membrane receptors. Thus, UTP itself could play important roles as a signaling molecule. In addition, UTP is more stable than ATP in presence of extracellular nucleotidases, hence increasing its extracellular effectiveness (Tuluc 2005).

Extracellular application of nucleotides to glial cells, such as ATP, stimulates astrogliosis responses leading to GFAP and astrocyte specific intermediate filament protein expression (Abbraccio 1994, Neary 1994, Tranke 2001). Furthermore, they have been also implicated in adhesion processes linked to P2Y receptor activation. For instance, in endothelial cells P2 stimulation increases adhesion molecules such as VCAM (Seye, 2004). Moreover, Mihn Tran et al described that astrocyte purinergic stimulation by UTP and ATP mediates N cadherin expression through P1 and P2 receptors and ERK/AKT activation, whereas in peripheral Schwann cells, molecules such as heregulin and neuregulin 1, through EGFR and MAPK activation had been also involved in N cadherin expression (Wanner 2006). Neural cadherin is a calcium dependent glycoprotein involved in cell-cell interactions (Takeishi 1988). It is expressed both in central and peripheral neurons and glial cells (Wanner Wood 2002, Kanemaru 2007) and involved in several processes such as cell-cell adhesion, embryogenesis, differentiation, migration and synaptic plasticity (Derycke, Bracke 2004; Okamura, 2004). In early stages of nerve formation and after axons-SCs injury disruption, neighbouring Schwann cells tend to associate with axon and re-establish cell contacts (Peters Muir 1959, Prestige and Wilson 1980, jessen 1994). Among some adhesion molecules, L1 (L1CAM) had been described as an important protein in this process but not the unique (Wood 1990, Haney 1999). In 1997 Yap et al postulated that N cadherin could contribute to the contact formation between SC and axons. In a recent work using rat neurons from dorsal root ganglions and SCs cocultures reported that N cadherin is of such importance in the assessment of SC-SC junction and SC process growth in alignment with axons (Wanner and Wood 2002). Moreover its expression might be involved in morphological changes as it has been described recently that lysophosphatidic acid (LPA) upregulates N cadherin and alter SCs morphology and adhesion (Weiner 2001).

Besides, UTP as a signal molecule can interact with P2 type purinergic receptors. These P2 receptors can be divided into 2 families, P2 ligand-gated ionotropic channels family P2X (1-7) and seven-transmembrane metabotropic G protein coupled receptors (P2Y 1-14) (Barnard 1994, North 1997, Burnstock Knight 2004). From up to now, 8 P2Y subtypes have been cloned in mammals (P2Y 1,2,4,6,11,12,13,14) (Burnstock 2007, Abbraccio 2008), and most of them have been localized in the nervous system (Lustig 1993, Valera 1994). P2Y family can be sorted out depending on the agonist preference (Von Kugelguen). On this basis, three of them have been described as uridine nucleotides sensitive receptors (P2Y2, 4, 6) (Nicholas 1996, communi 1996). P2Y receptors activation is usually coupled to PLC activation through Gq protein, intracellular calcium release, PKC and MAPK activation. As mentioned above, other SCs survival and differentiation factors such as neuregulin or LPA had been related to similar signalling pathways as it has been described AKT and MAPK activation as well. (Li

2001). In addition, activation of P2 receptors in neuronal cells increases Rho A protein which has been implicated in stress fibers apparition and morphological changes (Neary 1998).

The regulation of N cadherin expression has been studied in several cell lines (Derycke and Brake 2004, S le mée 2004), but there is a lack of information about how the signaling cascade driven by P2Y purinergic stimulation ends in N cadherin promoter regulation. In this study we demonstrate for the first time N cadherin upregulation in SCs by UTP and confirm that it depends on MAPK-AP1 binding sites cascade activation. An in sylico analysis of the human promoter gave us an idea about which transcription factor binding sites are important for its regulation. Among all, we found an important incidence of AP-1 binding sites which are regulated by c-fos and c-jun transcription factors levels. We also confirm an overexpression of these factors by UTP and correlate its up-regulation to MAPK activation. In conclusion, extracellular UTP could exert beneficial long term effects on SCs by regulating N cadherin expression through stimulation of MAPK and c-fos/c-jun transcription factors thus increasing n cadherin expression and favouring SC-SC and SC-axon contacts.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Reagents**

DMEM, penicillin, streptomycin, and glutamine were purchased from PAA (Linz, Austria). Donor Bovine Serum (DBS) was purchased from Gibco (Rockville, USA). ECL detection kit was from GE Healthcare (Wisconsin, USA). FITC-labelled phalloidin, suramin, Hoechst 33342, protease-phosphatase inhibitor cocktails, EGTA, SB202190, SP600125, U0126, Y27632, U73122, Calphostin C, CMP, UMP, UDP, and UTP were from Sigma–Aldrich (St Louis, USA). Anti-mouse and anti rabbit IgG peroxidase-conjugated secondary antibody and anti-mouse Alexa Fluor 405 were from Merck (Darmstadt, Germany). Fura-2 was from Invitrogen (Paisley, UK). All other reagents used were of analytical grade.

### **2.2 Cell culture and nucleotide treatment**

The rat schwannoma cell line RT4-D6P2T was purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, #93011415) and maintained in DMEM High Glucose medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin, 50 mg/L streptomycin, and 10% (v/v) DBS. Cultures were incubated in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37°C. Cells were seeded at a density of  $1.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> and starved in 1% (v/v) DBS for 24 h before nucleotide treatment.

### **2.3 Adhesion assays**

RT4 cells were seeded at a density of  $1.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. After 250 μM UTP treatment with o without EGTA 1 mM presence for 5 hours cells were “shake off” for 10 min with trypsin 0.05% at room temperature (for counting cells by tripan blue under inverted microscope) or for 30 min (for visualizing cluster formation under inverted microscope (20X)). Number of non adherent cells/mL were represented

respect control and clusters formation were visualized taking at least 10 photos at 20X and 40X for each condition .

## 2.4 Cell line transfection

The constructs corresponding to the total or deleted human N cadherin promoter were a gift from P.J.Marie, INSERM, Paris. Plasmid DNAs were purified using Mini kit columns system (Promega, USA). For the reporter assay, on the day before transfection, RT4-D6P2T cells were plated at a 100.000 c/mL density. Plasmids (0.7 µg for the reporter) were transfected using lipofectamin following the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). To correct the variations in transfection efficiency in the reporter assay, 15 ng of pGL3-Renilla (Promega, USA) were cotransfected in parallel. Luciferase activities were assayed at 48 h using Dual Luciferase reporter (Promega).

## 2.5 Quantitative real Time PCR

To generate a cDNA template, total RNA from 10<sup>6</sup> RT4 and SCs cells was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Scotland). RNA was reverse transcribed using an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Berkeley, California). cDNA template was analysed by quantitative analysis of cDNA amplification assessed by incorporation of SYBR Green into double strand DNA using SYBR Green Kit (BIORAD). Quantitative-PCR primers are detailed in table 1. All samples were analysed for GAPDH expression and was treated as an internal control. Cycling conditions were as follows:

PCR products were verified by melting curves analysis and the normalized expression of each gene respect GAPDH was computed by BIORAD analysis software.

Target gene	Accession number	Primers	Sequence
N cadherin	NM_031333.1	Forward Reverse	5'-GCACCAGGTTTGGAAATGGG3' 5'-CATGTTGGGAGAAGGGGTG-3'
P2Y2	NM_017255.1	Forward Reverse	5'-CTGCCAGGCACCCGTGCTCTACTT-3' 5'-CTGAGGTCAAGTGATCGGAAGGAG-3'
P2Y4	NM_031680.1	Forward Reverse	5'-CACCGATACCTGGGTATCTGCCAC-3' 5'-CAGACAGCAAAGACAGTCAGCACC-3'
P2Y6	NM_057124.2	Forward Reverse	5'-GGAGACCTTGCCTGCCCGCTGGTA-3' 5'-TACCACGACAGCCATACGGGCCGC-3'
C-jun	NM_021835.3	Forward Reverse	5'-GCGGCTGAAGTTGGGCGAGT-3' 5'-GGGTTAGCCTGGGCTGTGCG-3'
C-fos	NM_022197.2	Forward Reverse	5'-GGTCTCCTCCGTGGCCCCAT-3' 5'-CTTGACGGCAGGTCGGTGGG-3'
GAPDH	NM_017008.3	Forward Reverse	5'-TGGGAAGCTGGTCATCAAC-3' 5'-GCATACCCCATTTGATGTT-3'

**Table 1. Primers for quantitative real time PCR. NM\_ indicates the accession number of each gene in NCBI nucleotide base.**

## 2.7 Western blotting

After treatment with different nucleotides, the cells were washed with cold PBS and lysed in buffer that contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40 with protease and phosphatase inhibitors. The lysates were incubated on ice for 10 min and sonicated. Protein concentrations were measured by the Bradford protein [33]. Then, 30 µg of cell lysate were denatured with sample buffer (50 mM Tris-HCl, 2% (v/v) SDS, 100 mM DTT, 10% (v/v) glycerol, pH 6.8), subjected to 10% SDS/PAGE, and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Massachusetts, USA). The membranes were blocked for 1 h with 5% (w/v) dried skimmed milk in TBS-T buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 100 mM KCl and 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.4), and incubated with the primary antibodies indicated in Table.

Antibody binding was detected with HRP-coupled secondary antibody, and the bands were visualised by using the ECL detection system. The immunoreactive bands from western blotting were quantified using the Image J software.

## 2.8 Immunocytochemistry

After treatment with UTP, cells cultured on slides were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde. Cells were then rinsed three time for 5 min in PBS buffer containing 0.5% (w/v) BSA, permeabilized with PBS with Triton 0.2% (v/v), 0.5% (w/v) BSA and 20 mM glycine for 20 min, rinsed three time for 5 min in PBS containing 0.5% BSA and incubated with anti N cadherin and Hoechst 33342 (1 µg/mL) each diluted in blocking solution for 60 min at 25°C in the dark. Cells were rinsed and probed with an anti fluorescent secondary antibody for 1 h. Coverslips were rinsed twice for 5 min with PBS mounted with the anti-fading medium Mowiol (Sigma) and fluorescence microscopic images were obtained using a laser confocal microscope (Leika DM IRB, Wetzlar, Germany)

Primary antibodies				
Antibody	Origin	Dilution and Application		Commercial number
		WB	IC	
Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Policlonal rabbit	1:1000		#9101 Cell Signaling
Phospho-P38 (Tyr182/Thr180)	Policlonal rabbit	1:1000		ab4822 Abcam
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	Policlonal rabbit	1:1000		#9251 Cell signaling
ERK1/2	Policlonal rabbit	1:1000		#9102 Cell signaling
P38	Policlonal rabbit	1:1000		ab27986 Abcam
JNK	Policlonal rabbit	1:1000		#9252 Cell Signaling
E cadherin	Monoclonal mouse	1:500		610181 BD
N cadherin	Monoclonal mouse	1:1000	1:250	610921 BD
NCAM	Monoclonal mouse	1:1000		SC_71652 Sta Cruz
VCAM	Monoclonal mouse	1:1000		SC_53548 Sta Cruz
GAPDH	Monoclonal mouse	1:20000		AM4300 Applied Biosystems

**Table. List of primary antibodies used in Western blott (WB) and immunocytochemistry (IC).**

### 3. Statistical analysis

All the experiments were performed at least three times and statistical analyses were carried out using the GraphPad Prism package (ANOVA analysis plus Newman-Keuls post-test:  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ ).

## RESULTS

### Extracellular UTP increases cellular adhesion and N cadherin protein/ mRNA expression.

Cell-cell adhesion due to calcium dependent proteins can be inhibited by lowering extracellular calcium concentration (Takeishi 1988, Tamura 1998). In order to investigate the effects of UTP on RT4 schwannoma adhesion, cells were treated with or without an extracellular calcium chelating compound (EGTA) before UTP treatment. Cells were shaking off by trypsin for 10 min and photos were taken, finding after 5 hours of treatment, an increasing presence of cluster formation in cells treated with UTP respect control and a decrease in this formation after EGTA pre-treatment (Figure 1A). A quantitative analysis of non-adherent cells was performed using the same method. After 30 min of trypsin treatment, cells were dyed with tripan blue, counted and represented respect control. EGTA pre-treatment increased the number of non adherent cells in comparison to unique-UTP presence (Figure 1B). To further characterize which adhesion molecule was implicated on this effect, cells were treated with UTP and VCAM, NCAM, E cadherin and N cadherin protein expression was determined by immunoblotting. No signal was found for NCAM and E cadherin, and there was a faint signal for VCAM protein. We found that N cadherin protein expression was slight increased after 6 hours of UTP treatment and enhanced 12 hours after UTP treatment compared to control (Figure 1C). Afterwards, the subcellular distribution of N cadherin in SC and SC-SC cells was determined by immunofluorescence. RT4 cells were treated with UTP and stained with N cadherin antibody and the nuclei marker Hoescht. N cadherin showed different cell localization after UTP treatment. It led to have an increased signal at cytoplasm and Sc membranes containing neighbouring cells forming, in some cases, some kind of bands of attachment (arrows, Fig 1D) whereas in control cells there was a predominant perinuclear distribution (\*Fig 1D, a), thus demonstrating a possible translocation of N cadherin to the cellular membrane. After nucleotide treatment, not only the distribution was different but cell morphology changed as bipolar cells became flattened-shaped and showed extended lamellipodia formation similar to those astrogliosis phenomena visualized in astrocytes after ATP treatment (Neary). Furthermore, previous results after a proteomic approach by 2D-DIGE obtained in our laboratory indicated that UTP treatment results in a change in actin reorganization through regulation of the actin related protein 3 (). The results above suggest that UTP facilitates the expression and a different distribution of N cadherin protein in SC cells. Overall, N cadherin might be important for SC-SC contact formation and could play an important role in a possible axon-SC interaction.

### UTP treatment leads to N cadherin expression in a dose and time manner.

Before determining UTP effect on N cadherin expression we wanted to know if other uridine-based nucleotides (UMP or UDP) or ATP increased N cadherin expression on schwannoma cells. After nucleotide treatment, cells were lysed and immunoblotted against N cadherin and GAPDH. A significant increase (2 fold, p) on N cadherin was visualized after both UTP and ATP treatment (Figure 2A). Afterwards, to

determine the effect of extracellular UTP effects on N cadherin protein expression, dose response and time course studies were performed. RT4 cells were treated with several UTP concentrations ranging from 50 to 500  $\mu\text{M}$  and N cadherin protein expression was determined by immunoblotting. We found that N cadherin was significantly increased (from 2 to 3 fold times respect control,  $p$ ) after 250 and 500  $\mu\text{M}$  UTP treatment. (Figure 2B). The slight increase after 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  treatment was no significant. On a second approach, cells were treated with UTP for several times and N cadherin protein expression was visualized. At 24 hours there was a significant increase on N cadherin protein but at 3, 6 and 12 there was also a slight no-significant increase in its expression. (Figure 2C). To determine if the increase in N cadherin was regulated at a transcriptional level, RT4 cells were treated with UTP for various times from 30 min to 24 hours and quantitative real time PCR was performed. Despite we observed an increased protein expression after 24 hours of UTP treatment, only a significant transcription change was observed after 1 hour of UTP treatment (Figure 2D), suggesting a possible post translational regulation.

### **UTP-induced MAPK signaling activation on SCs cells**

P2 receptors have been reported to signal to MAPK (Shulte 2002, posar.ne més). UTP can interact with P2 receptors and stimulate several signaling cascades including calcium release, AKT or MAPK signaling pathway. As UTP is more difficult to be degraded by extracellular ectonucleotidases, its major effects are linked to P2 purinergic activation. To determine whether UTP-induced N cadherin expression is mediated by this pathway, we first studied if MAPK pathways were activated after UTP treatment. RT4 cells were treated with UTP at different doses ranging from 1 to 250  $\mu\text{M}$  and lysates were blotted against three phosphorylated MAPK: the mitogenic MAPK ERK1/2, and the two stress-related MAPK or SPKs JNK and P38. Surprisingly, the three of them were activated in some way in a dose manner ( $p$ ) (Figure 4A). Moreover, after a treatment with UTP for several times, we observed a maximum increased phosphorylation of the three kinases after short times (between 5 and 10 minutes after UTP treatment) ( $p$  n). For ERK  $\frac{1}{2}$  we found another activation peak after 2 hours, suggesting that the response might be activated afterwards in a similar way (data not shown). These data, along with the P2 data showed below, suggest that UTP is mediating MAPK pathway activation, not only of ERK as it was described but of other MAPK considered stress sensors such as JNK and P38.

### **MAPK inhibitors selective analysis. MAPK activation depends on P2Y signaling pathway.**

We respectively compared the selectivity effects of the MAPK inhibitors in Schwann cells. We used three different inhibitors, U0126 a MEK1/2 inhibitor (upstream kinase of ERK1/2 kinase), SB a P38 inhibitor and SP a JNK inhibitor. We found that the U0126 MEK  $\frac{1}{2}$  inhibitor wasn't only selective at blocking ERK  $\frac{1}{2}$  as we could observe an inhibition of phosphorylation of both P38 and JNK after UTP treatment ( $p$  n=)(Figure 6 A). On the other hand, only a slight crossing between P38 and JNK was observed after SB and UTP treatment.

To determine whether the phosphorylation of the three MAPK by extracellular UTP is mediated by P2 receptors and its consequently intracellular pathways activation, cultures were pre-treated with a non-selective antagonist P2Y receptor, suramin and after treated with UTP. As we can observe, there was a decrease in phosphorylation state of the MAPK (Fig). According to P2 described activation, there has been described several intracellular pathways activated such as Rho A, PLC, and PKC stimulation, hence further studies pre-treating RT4 cells with ROCK inhibitor Y ( $\text{Y}$ ), PLC inhibitor U7 ( $\text{U7}$ ) or PKC inhibitor

Calphostin before UTP treatment for 5 minutes were performed. The inhibitors blocked the response to UTP-induced MAPK phosphorylation as there was a significant decrease in fold phosphorylation after treatment, suggesting that RhoA, PLC and PKC are involved in MAPK phosphorylation (Figure 6B).

#### **MAPK signaling regulates UTP-mediated increase of N cadherin protein.**

Next question arised was if these signaling cascades were involved in UTP-induced increase of N cadherin. To determine whether they were involved, cells were pre-treated with the three different selective inhibitors: a MEK1/2 inhibitor (upstream ERK1/2 kinase, U0126), a P38 inhibitor (SB) or a JNK inhibitor (SP) and then treated with UTP. We found a significant decrease in the over expression of N cadherin after UTP treatment in pre-treated cells with inhibitors against P38 and ERK ½ ( $p \leq 0.01$ ). In contrast, there was a significant slight decrease in cells pre-treated with JNK inhibitor compared to UTP treated cells ( $*p \leq 0.05$ ) (Figure 5A). To further test a possible role in mRNA transcription we determine mRNA levels after pre-treatment with the selective inhibitors. As we previously found that UTP treatment induced an mRNA cadherin increasing peak at 1 hour of treatment (Figure), we tested if MAPK reduced mRNA levels after UTP treatment. Schwannoma cells were pre-treated with each inhibitor and then treated with UTP. Quantitative-real time demonstrated that each independent MAPK inhibitor induced a significant reduction in N cadherin mRNA levels ( $**p \leq 0.01$ ) and contrary to protein results even after JNK inhibitor (Figure 5B).

#### **UTP-induced N cadherin expression depends on AP1 binding sites presence in the promoter**

To characterize the sequence that is necessary for basal transcription of human N cadherin in Schwann cells, we analyzed by reporter assay various 5'deletions of the human N cadherin promoter. The public access to rat and human N cadherin sequences allowed us to search with BLAST (basic local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) the homology between both human and rat N cadherin promoter. We obtained an homology between the two sequences of 86% identity (data not shown. As shown in figure 3, transfection with the deletion corresponding to pGL3698/-18 construct showed a 55-fold increase respect pGL3-basic less the promoter. Deletions of promoter increase N cadherin promoter activity indicating the presence of repressor elements on the promoter. The promoter activity severely decreased when bases -214 to -74 were deleted. (Figure tal). These results are similar to those found in glial studies. In order to study whether AP1 transcription factor binding sites were crucial on N cadherin-UTP expression, RT4 cells were transfected with the pGL3 3698/-18 (complete sequence), pGL3 2620/-18 (3 AP1 sites left) or pGL3 1087/-18 (non AP1 sites) constructs and treated with UTP for 1 or 3 hours. Although after 3 hours there was an elevated increasing on promoter activity (8-fold respect control), we found a significant double-fold increase on promoter activity after treatment with UTP respect control and no effect on AP1-deleted promoter mutants. As we can observe, only one missing AP1 binding site was enough for UTP-induced promoter activity as there was a stadistically significant decrease on promoter activity similar to the results obtained with PGL3 1087/-18.

#### **Extracellular UTP increases c-fos and c-jun early genes expression**

We also examined the levels of two important early genes regulated by MAPK: c-fos and c-jun. Both had been described as down effectors of MAPK signaling pathways and are involved in the heterodimer transcription factor AP1 formation which, as demonstrated above, is of such importance in N cadherin expression. We performed quantitative real time analysis for the early genes c-fos and c-jun short times

ranging from 15 minutes to 6 hours. Interestingly, after UTP treatment, schwannoma cells significantly over express transcription factors, c-fos and c-jun, at the same time that overexpression of N cadherin was visualized. This data suggests that both factors may be involved in some way to its expression. Summing these results to the previous AP-1 site study we can conclude that MAPK could mediate N cadherin expression by regulating c-fos and c-jun transcription factors. Thus in order to elucidate whether MAPK pathway was involved in this regulation, cells were pre-treated with the different selective inhibitors of each MAPK for half an hour and then treated with UTP for 1 hour. We found that U0126 or SB caused a significant decrease in c-fos expression respectively, thereby indicating a role for both kinases in regulation of c-fos transcription factor. On the other hand, given that JNK is the major kinase related to cjun expression, the 7-fold up regulation after UTP treatment was significantly reverted by JNK inhibitor and in lesser extent by SB and U0126 pre-treatment. Taken together, the three MAPK, in diverse ways, are involved in the regulation of c-fos and c-jun levels in RT4 schwann cell.

## Discussion

The role of nucleotides in intracellular energy metabolism and nucleic acid has been known for a long time. But growing evidence presents that, in addition to these functions, they are capable to play as signalling molecules which initiate and regulate a large number of short-term and long term biological processes (Ralevic, bursntock 1998). Nucleotides can be release in the extracellular space under both physiological and pathological conditions by several processes including cell lysis, exocytosis, secretion of granules, efflux and upon cellular stress such as changes in osmolarity and electrical stimulation (Wu and Phillips 1978, Wieraszko 1989, Neary). All together, it has suggested that these molecules play key roles in normal functions and in repair processes after damage. Once released, they are able to stimulate nucleotide receptors: ionotropic P2X and metabotropic P2Y receptors which were first described by burnstock and Kennedy in 1970.

Most work on P2 receptors has been focused on CNS processes and there is a lack of information about its role in PNS. On this basis, several works have been performed on astrocytes responses to ATP (Tozaki-Saitoh H 2011, Köles 2011, Quintas C 2011) but little is known about how nucleotides affect other glia cells such as the peripheral myelinating one: Schwann cells. Schwann cells form the major glial population in PNS where they insulate axons with cytoplasmatic sheaths forming myelin and providing electrical insulation, essential for rapid impulse conduction (Peters 1970). It has been documented that in PNS, neurons and Schwann cells express purinergic receptors linked to release of intracellular calcium stores and other signal pathways such as MAPK activation (Ansselin 1997, Berti Mattera 1996, Lyons 1994, Lyons 1995, Verkhatsky 1995, Kobayashi 2006). We corroborate the presence of mRNA corresponding to P2Y<sub>2,4,6</sub> in rat RT4 cell line and primary rat neonatal SC culture (Fig) and visualized a high expression of P2Y<sub>2</sub> in both models and receptor activity by calcium imaging visualization (Fig). Some studies had described suramin as a relatively selective P2Y<sub>2</sub> antagonist (Nakamura 2011, Kemp PA 2004). More studies should be done, but it seems that P2Y<sub>2</sub> high presence in SC could be correlated directly to our results.

It has been described that ATP is able to activate both P2X and P2Y receptors but UTP, the main nucleotide used in this study, has only been described to autocrinely activate P2Y receptors. It has been described that these uridine-nucleotide species are released from resting or mechanically stimulated cells in concentrations capable of stimulating their respective receptors (Homolya, Lazarowski 1997, 2003). Moreover, despite their chemical stability, extracellular nucleotides are metabolized by several ecto-enzymes, but UTP has been described more stable than ATP to ectonucleotidases presence (Laes

Legers Goding Zimmerman). We believe that nucleotide-P2Y induced responses in Schwann cells could facilitate the expression of molecules involved in the regeneration of the damaged axon.

Adhesion molecules including N cadherin on axons or neighbouring SCs (Wanner and Wood, 2002, Letourneau 1991) and extracellular matrix molecules such as laminin (Milner 1997) had an important role in migration, differentiation and myelination processes in PNS. Many of these adhesive interactions lead to actin rearrangements and disruption of the cytoskeleton which has been related to myelination-demyelination processes (Fernandez Valle 1997). Little is known about the mechanisms involved in adhesion molecules by nucleotides in PNS neural cells. Recently, some groups described that activation of P2Y receptors in endothelial cells is related to molecules involved in adhesion such as VCAM and N cadherin (Neary 2007). On the other hand, studies with Schwann cells reported that molecules such as LPA or neuregulin or heregulin are involved in N cadherin expression through several signaling pathways involving MAPK (Wanner 2006). In this regard is also noteworthy that N cadherin is an important molecule in both CNS and PNS because of its importance in neurite outgrowth (Neugebauer 1988, Benson and Tanaka 1998 Kiryushko 2004, Hanson and Berezin 2008) and in synaptic rearrangement (Okamura 2004, Togashi 2002, Thoumine 2006). Moreover, Wanner and Wood in 2002 described that N cadherin was of such importance for SC-SC junctions formation and SC process growth in alignment with axons. Furthermore, it has been reported that N cadherin was primary expressed in SCs precursors restricted to the period of axon outgrowth, pointing them as a favourable substrate for axon growth (Wanner 2006).

Firstly, we analysed the effects of extracellular UTP on transcription and protein N cadherin level. We observed a time and dose dependent increased on protein reaching the maximum peak at 24 hours and at doses up to 100  $\mu\text{M}$ . Contrary to what we expected we only observed an up-regulated mRNA level at an earlier time point (1 hour of treatment). It has been described that correlation between mRNA levels will not necessarily be conserved in the corresponding proteins levels because of differences in posttranscriptional modifications and regulation (Wang 2010, Fournier 2010 repamicyn). Thus, we performed several studies using cycloheximide to see N cadherin protein half life possible modifications, but no changes were found between control and UTP treated cells (data not shown). So we conclude that some mRNA stability and translational events are involved in this concept of time-delayed coexpression pattern visualized between mRNA and protein levels of N cadherin after UTP treatment.

In a previous study, we reported that nucleotides triggered actin rearrangements in Schwann cells by a 2D-DIGE approach. Here we demonstrate that there were not only actin rearrangements but there was also a different N cadherin localization from perinuclear distribution (in control cells) to cytoplasmatic space and cell-cell interactions (in UTP treated cells).

To gain more insights into P2YR activation in SC cells, we wanted to study if some P2Y related signaling pathways were activated after UTP treatment. The signaling pathways activated by extracellular nucleotides are usually coupled to PLC activation, intracellular calcium stores release and activation of kinases such as PKC, AKT and MAPK (Communi, Svadicani). We were able to observe a phosphorylation in short times (from 5 to 10 minutes) of three MAPK: the mitogenic related ERK1/2 and the two stress-related kinases P38 and JNK suggesting that UTP is acting as a stress factor to SCs. These three MAPK pathways are involved in regulating proliferation, differentiation and cell survival in a variety of cells. No differences on proliferation on these RT4 cells were found (data not shown). Previous studies reported a trophic role of nucleotides in glial cells (Neary, 2000) or differentiation roles in neural-like PC12 cells (Halfar, 2001). Contrary to that, it has been described in Schwann cells that a continuously activation of Ras/Raf/ERK conduces SCs to a dedifferentiate state without proliferation (Ridley 1988, Harrising 2004). Moreover, not only ERK has been implicated in dedifferentiation processes but P38 (despite having

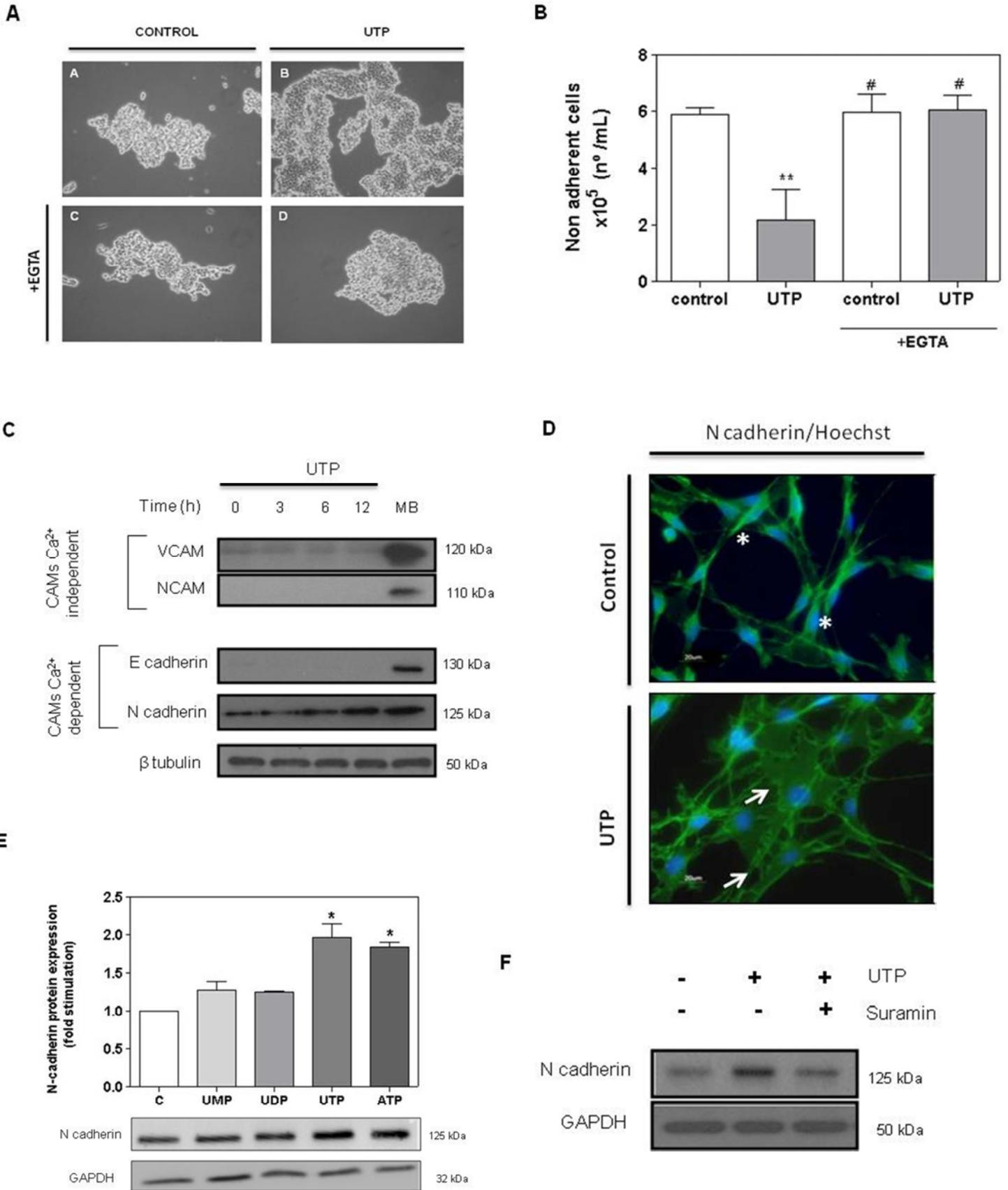
important roles in myelination processes) has been described as a myelination suppressor (Fragoso 2003). On the other hand, JNK modifies the activity of several transcription factors such as c-jun which is (as commented later) of such importance in dedifferentiation SCs state.

Because of discarding which kinase was mediating N-cadherin up-regulation, we used three selective inhibitors for each MAPK. We investigated the role of each kinase by using U0126, a selective inhibitor of MEK (upstream activator of ERK), SP (a selective inhibitor of JNK) and SB (a selective inhibitor of p38). We showed previously that the inhibition effect was not selective for each kinase. MEK inhibitor inhibited UTP-induced phosphorylation of p38 and JNK and there was a slight crosstalk between p38 and JNK after using SB inhibitor. Moreover, we showed a reducing level of phosphorylation on MAPK using several upstream P2Y signaling pathway inhibitors. We demonstrated that MAPK phosphorylation depends on P2 receptor activation as we saw a diminishing signal after antagonist suramin presence, PLC, ROCK kinase and PKC inhibition, thereby suggesting that PKC and Rho kinase might be involved in the UTP-mediated response of MAPK. Further studies are needed to know which role play each kinase in N-cadherin up-regulation.

MAPK pathways are known to influence gene expression through phosphorylation/activation of transcriptional factors. Among them, some transcription factors such as c-jun has been related to dedifferentiation and myelin inactivation in Schwann cells (Jessen and Mirsky). Moreover, evidence has accumulated to suggest induction of specific gene families in glial cells upon exposure to extracellular nucleotides and activation of P2 receptors. It has been described that extracellular nucleotides induce immediate early genes expression in rat microglial cells (Priller 1995). Moreover, Bolego et al reported in 1997 nuclear accumulation of fos and jun proteins upon exposure of striatal astrocytes to nucleotides. Both, c-jun and c-fos were already known to dimerise and form activated AP-1 transcriptional factors that could bind to specific sequences on the promoter regions on many genes. Brambilla R et al demonstrated that nucleotide presence in astrocytes resulted in a time-dependent increase in DNA binding activity of AP-1 and that AP-1 DNA binding significantly increased after 30'-1 h nucleotide treatment, consistent to ERK 1/2 kinase activation (10 minutes after treatment). Importantly, these previous results are also consistent with our results as we visualized similar events after UTP treatment. Based on morphological changes and different phenotype shape visualized (Fig) we wanted to know whether some transcription factor changed in our cell line after treatment. We studied if c-fos and c-jun transcription factors were regulated by MAPK and positively control N-cadherin expression. Surprisingly, an up-regulation of c-jun and c-fos was visualized after 1 hour of UTP treatment, in agreement with UTP-induced N-cadherin mRNA up-regulation (Fig). It has been described that the myelination status of Schwann cells can be viewed as being determined by the balance between different transcription factors presence. It has been classified as positive regulators factors Krox-20, OCT-6, SOX 10, BRN 2 and NFK B (related all of them to a myelinated state) and negative regulators c-jun, NOTCH, SOX-2, PAX 3 and Id 2 (related all of the, to immature-denervated state) (Kristj an Jessen 2008). Several works describe the antagonistic effect between krox-20 and c-jun, pointing the last one as a undifferentiation factor (Le Nagarajan, 2005). An *in silico* study previously done Le...about human N-cadherin promoter showed a high presence in AP-1 binding sites. AP-1 promoter site has been described as DNA-binding by the c-fos c-jun heterodimers or c-jun homodimers complex (Turner 1989). We show reporter studies that support the AP-1 binding site importance in N-cadherin promoter as its presence is necessary for UTP-increased N-cadherin promoter activity. These conclusions may exert significant control over the timing and extent of remyelination, as our results of c-fos and c-jun overexpression after UTP treatment may explain N-cadherin up-regulation and a possible SCs immature phenotype apparition.

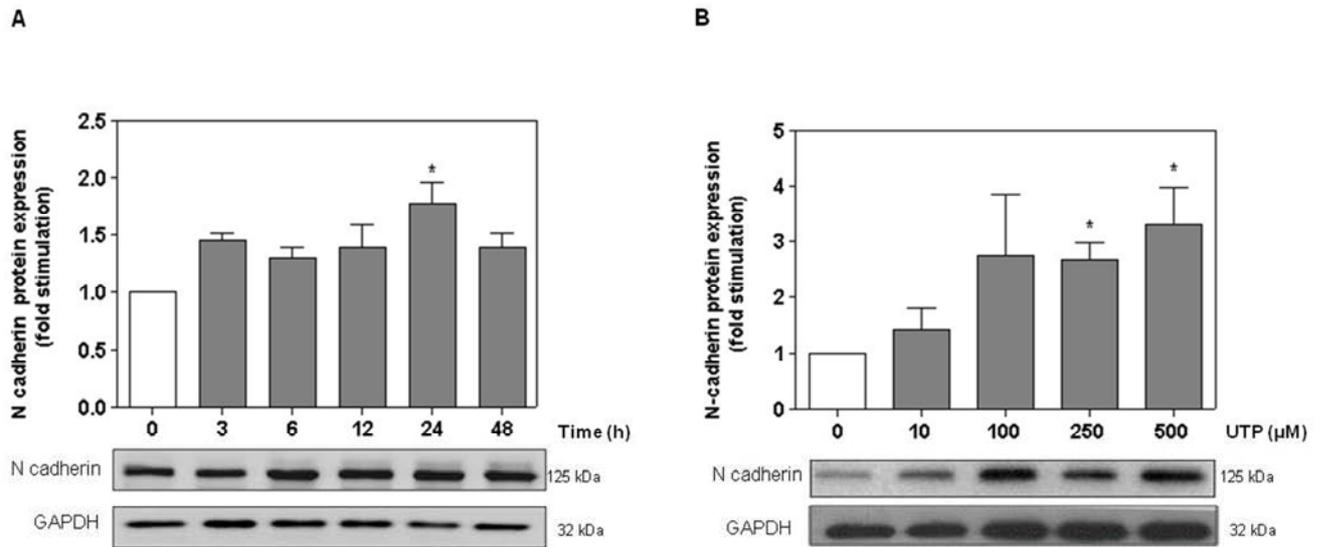
Here we report for the first time that extracellular UTP in SCs causes an upregulation in N cadherin mRNA, protein levels and a different cell localization, suggesting that P2Y receptors may be involved in regulating expression and localization of N cadherin. All together, as summarized in figure we can say that nucleotides could be acting as stress molecules inducing a dedifferentiate state in SC and leading some protein upregulation such as N cadherin which may be beneficial for SC-SC and SC-axon contacts and axon repairing processes.

FIGURE 1



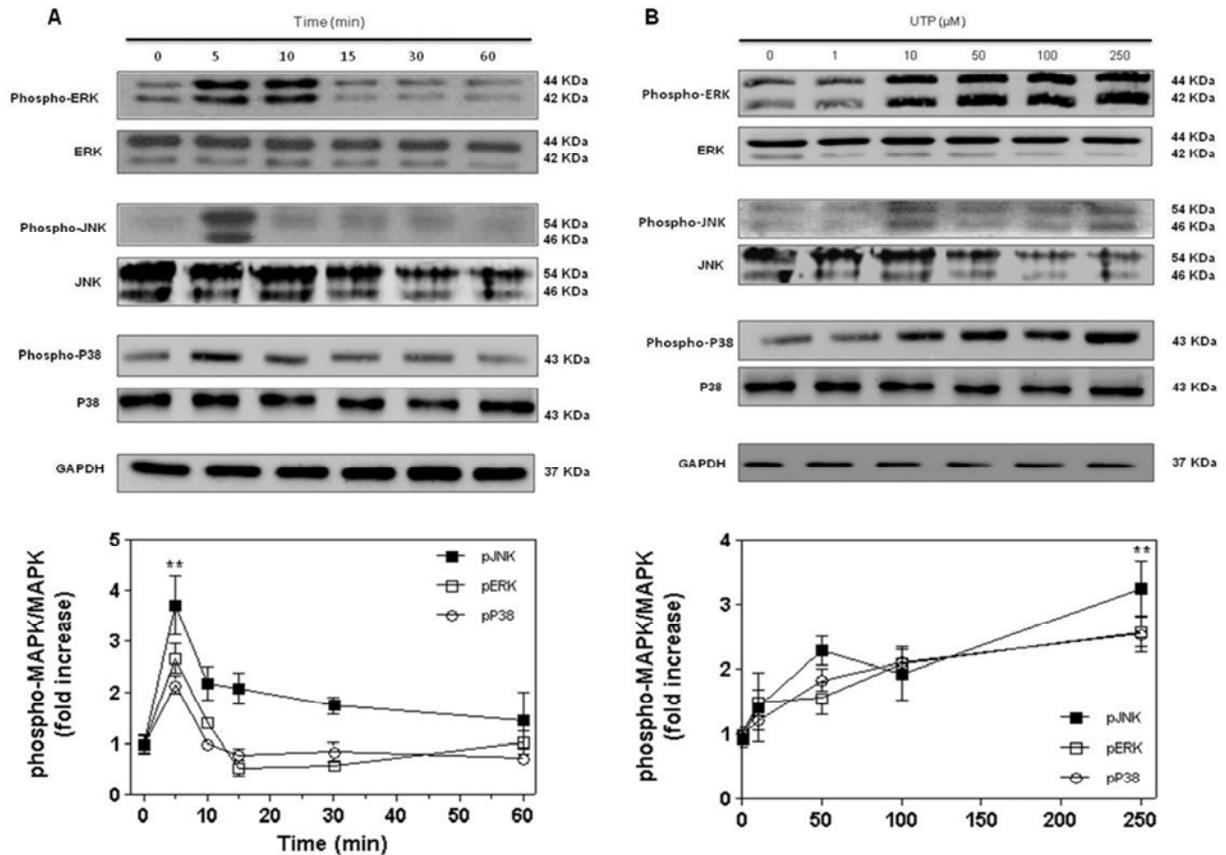
**Figure 1.** UTP treatment increases both cell adhesion in a calcium dependent manner and Neural cadherin expression in RT4 Schwann cell model. (A) Visualization on an inverted microscope (20X) of adhesion after "shake off" method with trypsin treatment. Cells were treated with UTP 250  $\mu$ M for 5 hours with (c, d) or without EGTA pre-treatment (1mM, 20 minutes) (b) respect control (a). (B) Quantification of non adherent cells under low calcium conditions. Cells were counted after slow trypsinization using tripan blue staining (1:2). Non adherent cells treated with 250  $\mu$ M UTP in presence or absence of 1 mM EGTA are represented respect their controls. The differences between control and low calcium condition were statistically significant after 5 hours (ANOVA test  $**p \leq 0.001$ ) (C) Western blots were performed using 30  $\mu$ g of RT4 lysates treated in a time manner with UTP 250  $\mu$ M. Samples were either probed for 2 independent calcium adhesion molecules (VCAM and NCAM) for two dependent CAM (N cadherin and E cadherin) or  $\beta$  tubulin. They were compared with a positive control sample (mouse brain, MS). The autoradiogram shows no signal for NCAM and E cadherin and a faint signal for VCAM. N cadherin shows an increasing signal in a time manner response. Western blots images are representative from three independent experiments. (D) N cadherin is redistributed after UTP treatment. RT4 cells were stained for N cadherin (green) and Hoeschst 33342 (blue) 12 h after 250  $\mu$ M UTP treatment. Images show N cadherin localized to perinuclear localization (\*) in control cells (a) and to cytoplasm or cell-cell contact (arrows) after UTP treatment (b). Scale bars 20  $\mu$ m.

FIGURE 2



**Figure 2.** Extracellular UTP increases both mRNA and protein N cadherin expression. (A) UTP and ATP increased N cadherin protein expression. RT4 cells were treated with 250  $\mu$ M extracellular UMP, UDP, UTP and ATP for 24 hours. After nucleotide treatment, cells were lysed and immunoblots were performed using antibodies against N cadherin and GAPDH. (B) Extracellular UTP increased N cadherin expression in a dose dependent manner. Lysates from cells treated during 24 hours with increasing concentrations of UTP were probed by immunoblotting with antibodies against N cadherin and GAPDH (C, D) Cells were treated with 250  $\mu$ M extracellular UTP for various times, as indicated at the bottom of the figures. N cadherin expression was measured either by Western blot or Real Time PCR. GAPDH was used as constitutive gene. All the results are representative of three independent experiments.

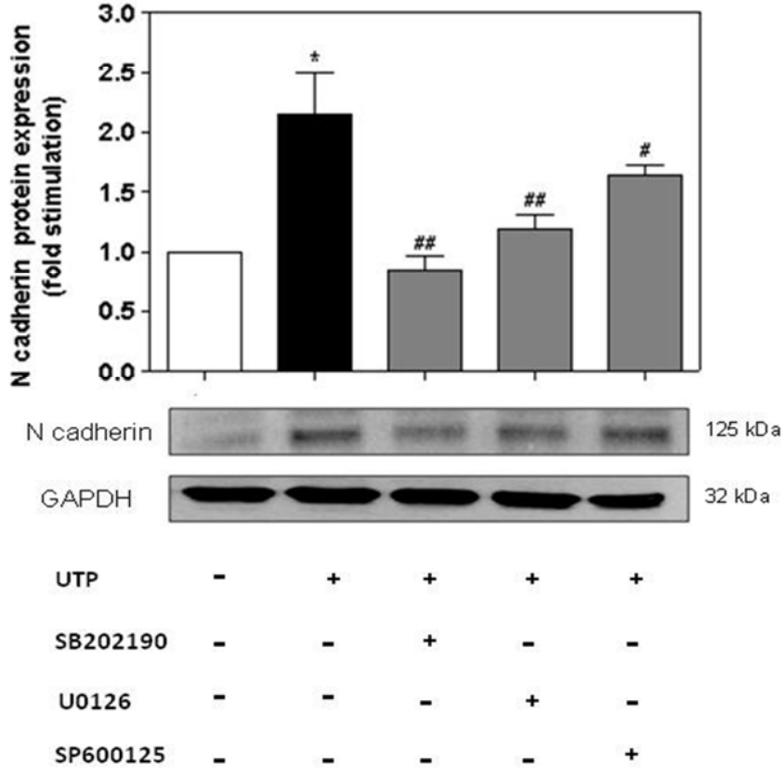
FIGURE 3



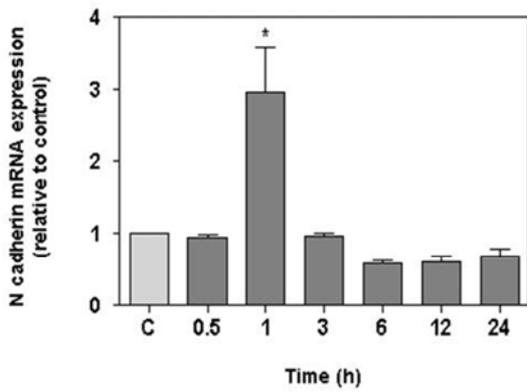
**Figure 3.** Involvement of extracellular UTP in MAPK activation (A) Schwannoma RT4 cells were treated with several concentrations of UTP for 5 min and Western blots were performed for each MAPK (P38, JNK and ERK1/2) and GAPDH. Two bands were measured for both JNK and ERK and summed. MAPK activity is expressed as phosphorylated MAPK/total MAPK ratio and the control was assigned as 1 fold activation. (B) RT4 cells were treated with UTP (250  $\mu$ M). After short times cells were lysated and immunoblots were performed. A representative immunoblot for each kinase (P38, JNK and ERK 1/2) are represented. Group data from at least four independent experiments were expressed as fold stimulation (ANOVA plus Newman Keuls post test, \*\* $p \leq 0.001$ ).

FIGURE 4

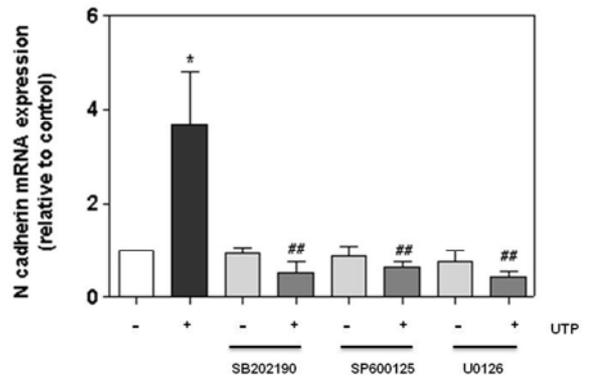
A



B

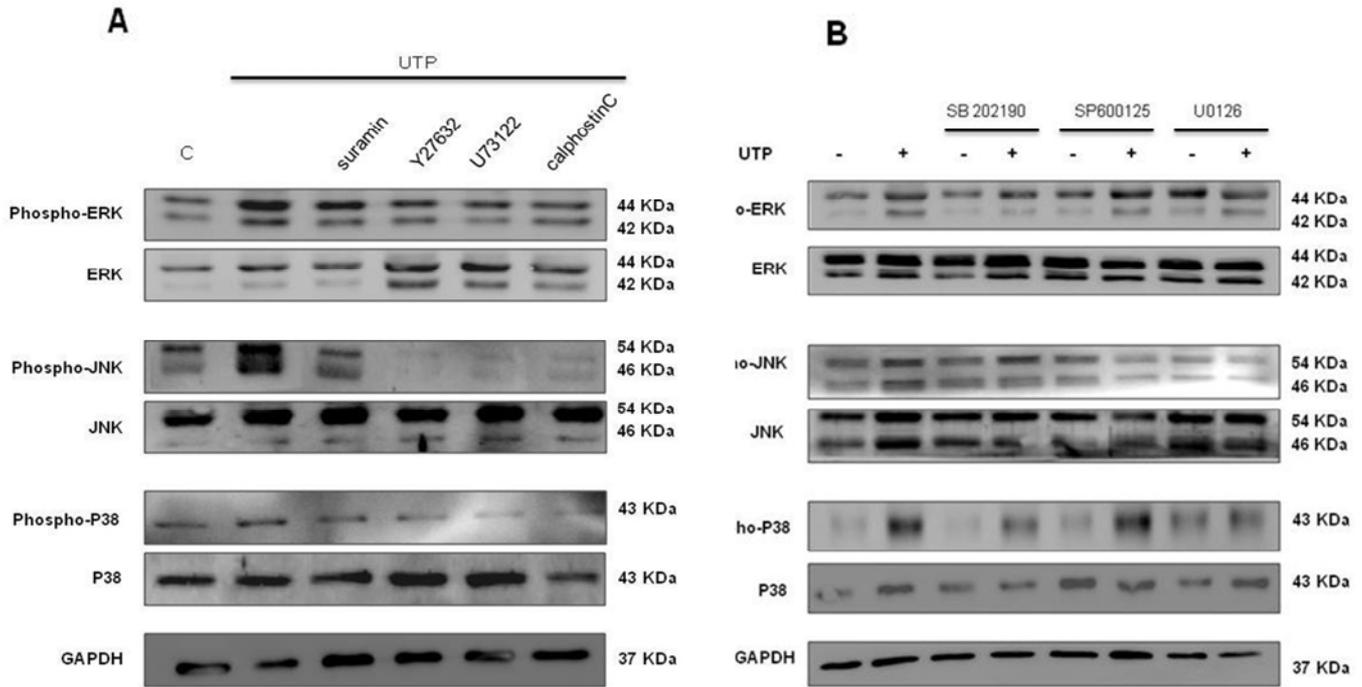


C



**Figure 4.** Involvement of MAPK pathway in UTP-mediated N cadherin protein and mRNA expression. Before treatment with UTP (250  $\mu$ M) cells were pre-treated for 30 minutes with 10  $\mu$ M of selective inhibitors U0126 (selective inhibitor of mitogen-activated protein kinase (MEK)/ERK kinase), SP (selective inhibitor of JNK) and SB (selective inhibitor of P38). After 24 hours of extracellular UTP treatment, cells were immunoblotted against N cadherin or real time PCR were performed. (A) Representative immunoblot that shows the UTP-induced expression inhibition after pre-treatment with selective inhibitors for each kinase. (Group data from three independent experiments were expressed as fold stimulation (ANOVA plus Newman Keuls post test,  $**p \leq 0.001$ ,  $*p \leq 0.05$ ).

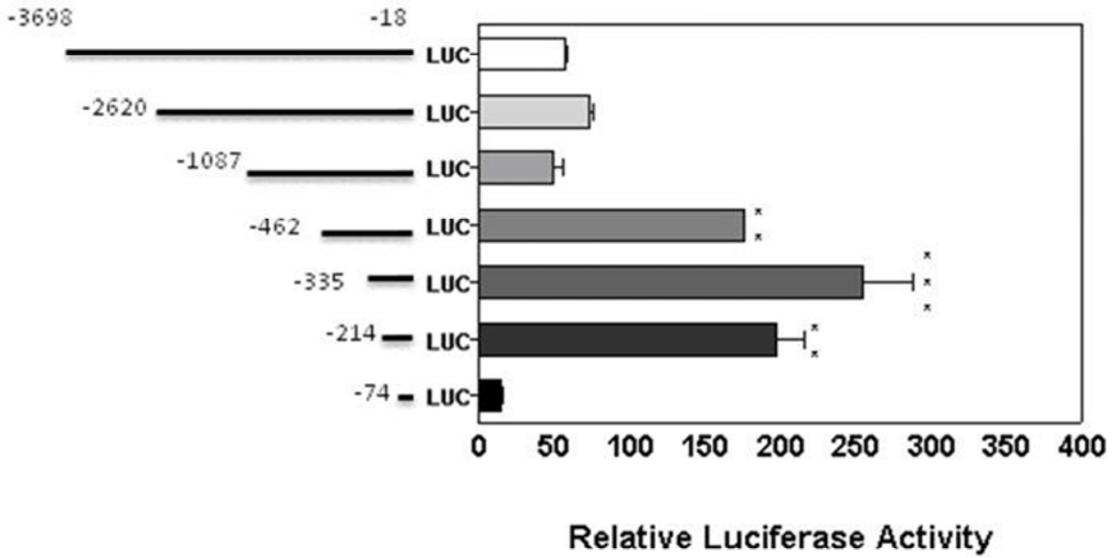
FIGURE 5



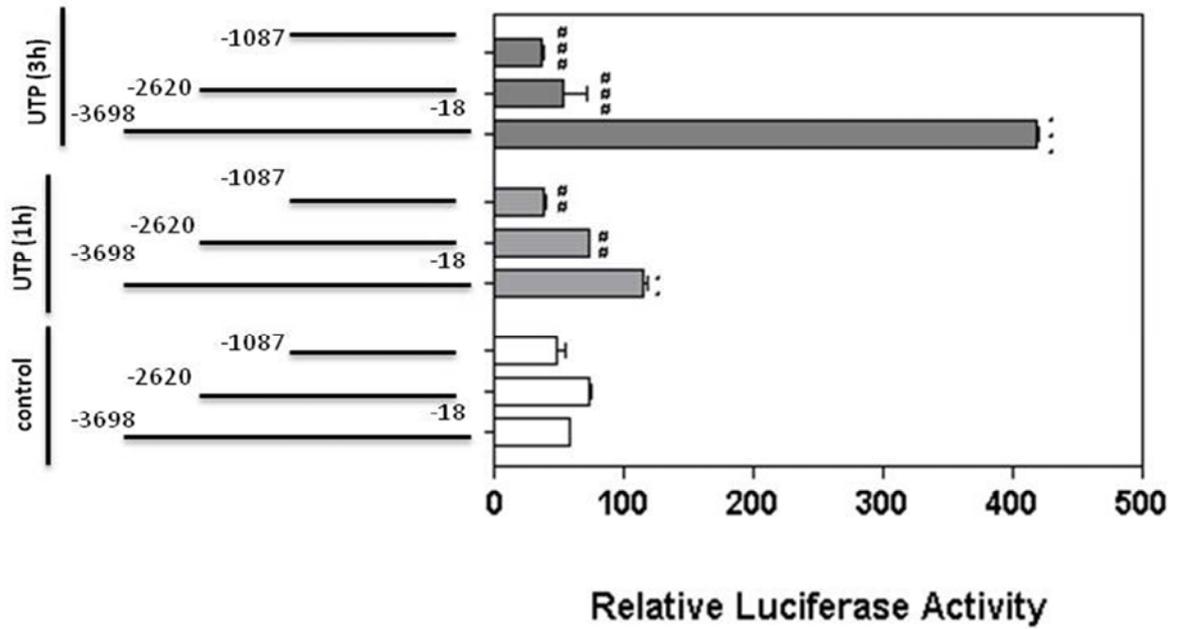
**Figure 5. (A) Visualization of crosstalk between MAPK activation by UTP in RT4 cells.** Before treatment with UTP (250  $\mu$ M) cells were pre-treated for 30 minutes with 10  $\mu$ M of selective inhibitors U0126 (selective inhibitor of mitogen-activated protein kinase (MEK)/ERK kinase), SP (selective inhibitor of JNK) and SB (selective inhibitor of P38). After 5 minutes of extracellular UTP treatment, cells were immunoblotted against each MAPK (ERK1/2, JNK and P38). A representative immunoblot that shows the UTP-induced expression inhibition after pre-treatment with selective inhibitors for each kinase. Group data from at least four independent experiments were expressed as fold stimulation (ANOVA,  $**p \leq 0.001$ ,  $*p \leq 0.05$ ). **(B) UTP-induced MAPK activation depends on P2YR signaling pathway.** (A) Before treatment with UTP (250  $\mu$ M) RT4 cells were pre-treated for 30 minutes with selective inhibitors of different proteins involved in P2YR signaling cascade. They were either pre-treated with 100  $\mu$ M for the non selective P2Y antagonist Suramin, 10  $\mu$ M of the ROCK inhibitor Y27632, 10  $\mu$ M of PLC inhibitor U73122 or 10  $\mu$ M of PKC inhibitor Calphostin C. After 5 minutes of extracellular UTP treatment, cells lysates were immunoblotted against each phosphorylated or total MAPK (ERK1/2, JNK and P38) and GAPDH. A representative immunoblot that shows the UTP-induced expression inhibition after pre-treatment with selective inhibitors is shown. Group data from at least four independent experiments were expressed as fold stimulation (ANOVA,  $**p \leq 0.001$ ,  $*p \leq 0.05$ ).

FIGURE 6

A

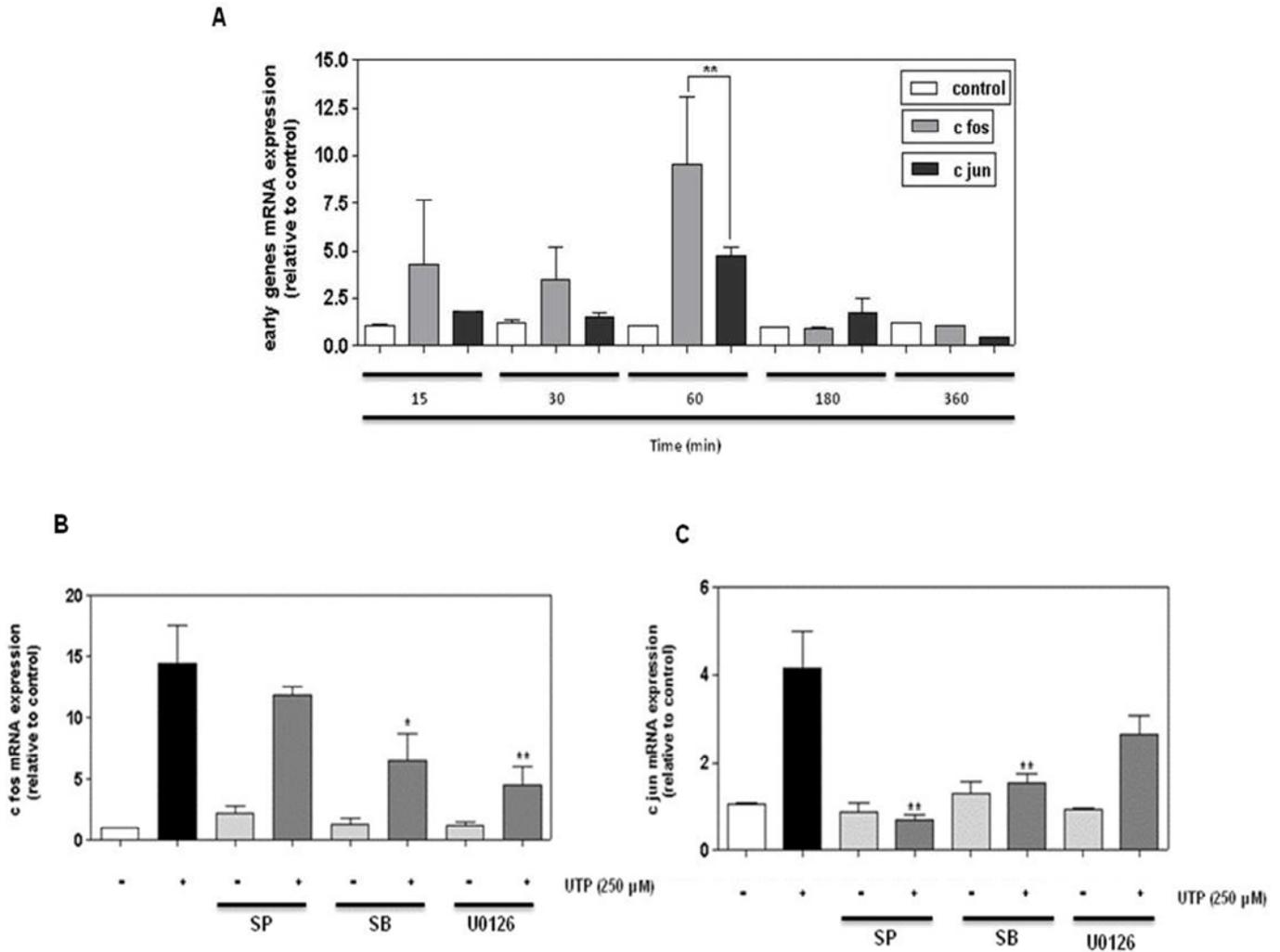


B



**Figure 6. Identification of the minimal region required for the basal human N cadherin promoter activity in Schwann cells. (A)** RT4 Schwann cells were cotransfected with lipofectamin with a series of 5'-deletion mutants of the human N cadherin promoter linked to luciferase and pGL3 linked to Renilla activity. Luciferase activity was visualized after 48 hours and normalized to levels of renilla. Data represent transcriptional activities related to the empty pGL3 basic plasmid. The results are the mean  $\pm$  SD of two independent experiments performed in triplicate. **(B) Significance of AP1 binding sites in the UTP-regulation of N cadherin promoter expression.** RT4 Schwann cells were either cotransfected with the human complete sequence of N cadherin promoter or two 5'-deletion mutants in different zones containing AP1 binding sites linked to luciferase and pGL3 linked to Renilla activity. After 48 hours, RT4 transfected cells were treated with UTP 250  $\mu$ M for 1 (grey boxes) or 3 hours (black boxes) and luciferase activity was analysed. Luciferase activity was normalized to levels of Renilla. Data represent transcriptional activities related to the empty pGL3 basic plasmid. The results are the mean  $\pm$  SD of two independent experiments performed in triplicate (ANOVA, \*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\* $\leq 0.0001$ ).

FIGURE 7



**Figure 7. UTP induced overexpression of c-fos and c-jun early genes in RT4 cells through MAPK activation.** (A) RT4 cells were treated with UTP 250  $\mu$ M for several times. Total RNA was subjected to Real Time analysis as described in Material and Methods. C-fos or c-jun/GAPDH ratios were determined, and data from three independent experiments were expressed as fold stimulation (mean $\pm$ SD) compared to controls. (B, C) Before treatment with UTP (250  $\mu$ M) cells were pre-treated for 30 minutes with 10  $\mu$ M of selective inhibitors U0126 (selective inhibitor of mitogen-activated protein kinase (MEK)/ERK kinase), SP (selective inhibitor of JNK) and SB (selective inhibitor of P38). After treatment with UTP 250  $\mu$ M for 1 hour mRNA was obtained and subjected to Real Time analysis for c-fos, c-jun and GAPDH. The results are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate (ANOVA, \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.001$ ).



**ARTÍCULO 2.**

*"Generation of digital responses in stress sensors".*

*Tània Martíàñez, Sílvia Francès, José Manuel López Blanco.*

*Journal of Biological Chemistry, 2009, 284, 23902-2391.*



**ARTÍCULO 3.**

*"A nucleotide-based drug protects against glutamate- and MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity"*

*Alejandro Gella, Tània Martiàñez, Aloa Lamarca, Cristina Gutiérrez, Núria Durany, Núria Casals.  
Neuroscience and Medicine, 2011, 2, 154-160.*



**ARTÍCULO 4.**

*"Modulation of Amyloid B peptide 1-42 citotoxicity and aggregation in vitro by glucose and chondroitin sulphate".*

*X. Fernández Busquets, J.Ponce, R.Bravo, M.Arimon, T. Martíáñez,  
A.Gella, J.Cladera, N.Durany.*

*Current Alzheimer Disease, 2010, 7, 428-438*



## **XIII. BIBLIOGRAFÍA**



**A**

ABBRACCHIO, M. P.; and BURNSTOCK, G. Purinoceptors: Are there Families of P2X and P2Y Purinoceptors?. *Pharmacology & Therapeutics*, 1994, vol. 64, no. 3, pp. 445-475. ISSN 0163-7258; 0163-7258.

ABBRACCHIO, M. P., et al. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacological Reviews*, Sep, 2006, vol. 58, no. 3, pp. 281-341. ISSN 0031-6997; 0031-6997.

ABBRACCHIO, M. P., et al. Purinergic Signalling in the Nervous System: An Overview. *Trends in Neurosciences*, 20081112, Jan, 2009, vol. 32, no. 1, pp. 19-29. ISSN 0166-2236; 0166-2236.

ACHESON, A., et al. Detection of Brain-Derived Neurotrophic Factor-Like Activity in Fibroblasts and Schwann Cells: Inhibition by Antibodies to NGF. *Neuron*, Aug, 1991, vol. 7, no. 2, pp. 265-275. ISSN 0896-6273; 0896-6273.

AGRESTI, C., et al. Metabotropic P2 Receptor Activation Regulates Oligodendrocyte Progenitor Migration and Development. *Glia*, Apr 15, 2005a, vol. 50, no. 2, pp. 132-144. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

AGRESTI, C., et al. ATP Regulates Oligodendrocyte Progenitor Migration, Proliferation, and Differentiation: Involvement of Metabotropic P2 Receptors. *Brain Research.Brain Research Reviews*, 20050122, Apr, 2005b, vol. 48, no. 2, pp. 157-165.

ANGEL, P., et al. The Jun Proto-Oncogene is Positively Autoregulated by its Product, Jun/AP-1. *Cell*, Dec 2, 1988, vol. 55, no. 5, pp. 875-885. ISSN 0092-8674; 0092-8674.

ANSSELIN, A. D.; DAVEY, D. F.and ALLEN, D. G. Extracellular ATP Increases Intracellular Calcium in Cultured Adult Schwann Cells. *Neuroscience*, Feb, 1997, vol. 76, no. 3, pp. 947-955. ISSN 0306-4522; 0306-4522.

ARIKKATH, J. N-Cadherin: Stabilizing Synapses. *The Journal of Cell Biology*, May 3, 2010, vol. 189, no. 3, pp. 397-398. ISSN 1540-8140; 0021-9525.

ARSLAN, G.; and FREDHOLM, B. B. Stimulatory and Inhibitory Effects of Adenosine A(2A) Receptors on Nerve Growth Factor-Induced Phosphorylation of Extracellular Regulated Kinases 1/2 in PC12 Cells. *Neuroscience Letters*, Oct 13, 2000, vol. 292, no. 3, pp. 183-186. ISSN 0304-3940; 0304-3940.

ATANASOSKI, S., et al. ErbB2 Signaling in Schwann Cells is mostly Dispensable for

Maintenance of Myelinated Peripheral Nerves and Proliferation of Adult Schwann Cells After Injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Feb 15, 2006, vol. 26, no. 7, pp. 2124-2131. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

ATKINSON, M. A.; and EISENBARTH, G. S. Type 1 Diabetes: New Perspectives on Disease Pathogenesis and Treatment. *Lancet*, Jul 21, 2001, vol. 358, no. 9277, pp. 221-229. ISSN 0140-6736; 0140-6736.

**B**

BALICE-GORDON, R. J.; BONE, L. J.and SCHERER, S. S. Functional Gap Junctions in the Schwann Cell Myelin Sheath. *The Journal of Cell Biology*, Aug 24, 1998, vol. 142, no. 4, pp. 1095-1104. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

BANSAL, R.; and PFEIFFER, S. E. Regulated Galactolipid Synthesis and Cell Surface Expression in Schwann Cell Line D6P2T. *Journal of Neurochemistry*, Dec, 1987, vol. 49, no. 6, pp. 1902-1911. ISSN 0022-3042; 0022-3042.

BARBER, S. C., et al. S1P and LPA Trigger Schwann Cell Actin Changes and Migration. *The European Journal of Neuroscience*, Jun, 2004, vol. 19, no. 12, pp. 3142-3150. ISSN 0953-816X; 0953-816X.

BARRERA, N. P.; HENDERSON, R. M.and EDWARDSON, J. M. Determination of the Architecture of Ionotropic Receptors using AFM Imaging. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 20071117, Apr, 2008, vol. 456, no. 1, pp. 199-209. ISSN 0031-6768; 0031-6768.

BENSON, D. L.; and TANAKA, H. N-Cadherin Redistribution during Synaptogenesis in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Sep 1, 1998, vol. 18, no. 17, pp. 6892-6904. ISSN 0270-6474; 0270-6474.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.and LIPP, P. Calcium--a Life and Death Signal. *Nature*, Oct 15, 1998, vol. 395, no. 6703, pp. 645-648. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

BERTI-MATTERA, L. N., et al. P2-Purigenic Receptors Regulate Phospholipase C and Adenylate Cyclase Activities in Immortalized Schwann Cells. *The Biochemical Journal*, Mar 1, 1996a, vol. 314 ( Pt 2), no. Pt 2, pp. 555-561. ISSN 0264-6021; 0264-6021.

BERTI-MATTERA, L. N., et al. P2-Purigenic Receptors Regulate Phospholipase C and Adenylate Cyclase Activities in Immortalized Schwann Cells. *The Biochemical Journal*, Mar 1, 1996b, vol. 314 ( Pt 2), no. Pt 2, pp. 555-561. ISSN 0264-6021; 0264-6021.

- BESIRLI, C. G.; and JOHNSON, E. M., Jr. JNK-Independent Activation of c-Jun during Neuronal Apoptosis Induced by Multiple DNA-Damaging Agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 20030408, Jun 20, 2003, vol. 278, no. 25, pp. 22357-22366. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- BIRCHMEIER, C.; and NAVE, K. A. Neuregulin-1, a Key Axonal Signal that Drives Schwann Cell Growth and Differentiation. *Glia*, Nov 1, 2008, vol. 56, no. 14, pp. 1491-1497. ISSN 1098-1136; 0894-1491.
- BOEYNAEMS, J. M., et al. Overview of the P2 Receptors. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, Apr, 2005, vol. 31, no. 2, pp. 139-149. ISSN 0094-6176; 0094-6176.
- BOIVIN, A., et al. Toll-Like Receptor Signaling is Critical for Wallerian Degeneration and Functional Recovery After Peripheral Nerve Injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Nov 14, 2007, vol. 27, no. 46, pp. 12565-12576. ISSN 1529-2401; 0270-6474.
- BOYER, J. L., et al. 2-Chloro N(6)-Methyl-(N)-Methanocarpa-2'-Deoxyadenosine-3',5'-Bisphosphate is a Selective High Affinity P2Y(1) Receptor Antagonist. *British Journal of Pharmacology*, Apr, 2002, vol. 135, no. 8, pp. 2004-2010. ISSN 0007-1188; 0007-1188.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, May 7, 1976, vol. 72, pp. 248-254. ISSN 0003-2697; 0003-2697.
- BRAMBILLA, R., et al. Induction of COX-2 and Reactive Gliosis by P2Y Receptors in Rat Cortical Astrocytes is Dependent on ERK1/2 but Independent of Calcium Signalling. *Journal of Neurochemistry*, Dec, 2002, vol. 83, no. 6, pp. 1285-1296. ISSN 0022-3042; 0022-3042.
- BRAUTIGAM, V. M., et al. Purinergic Receptor Modulation of BV-2 Microglial Cell Activity: Potential Involvement of p38 MAP Kinase and CREB. *Journal of Neuroimmunology*, Sep, 2005, vol. 166, no. 1-2, pp. 113-125. ISSN 0165-5728; 0165-5728.
- BUCHHOLZ, J. N., et al. Age-Dependent Changes in Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Peripheral Neurons: Implications for Changes in Function. *Aging Cell*, Jun, 2007, vol. 6, no. 3, pp. 285-296. ISSN 1474-9718; 1474-9718.
- BUNGE, M. B.; WILLIAMS, A. K. and WOOD, P. M. Neuron-Schwann Cell Interaction in Basal Lamina Formation. *Developmental Biology*, Aug, 1982, vol. 92, no. 2, pp. 449-460. ISSN 0012-1606; 0012-1606.
- BUNGE, R. P. Expanding Roles for the Schwann Cell: Ensheathment, Myelination, Trophism and Regeneration. *Current Opinion in Neurobiology*, Oct, 1993, vol. 3, no. 5, pp. 805-809. ISSN 0959-4388; 0959-4388.
- BUNGE, R. P.; BUNGE, M. B. and BATES, M. Movements of the Schwann Cell Nucleus Implicate Progression of the Inner (Axon-Related) Schwann Cell Process during Myelination. *The Journal of Cell Biology*, Jul, 1989, vol. 109, no. 1, pp. 273-284. ISSN 0021-9525; 0021-9525.
- BURNSTOCK, G. Purinergic Receptors and Pain. *Current Pharmaceutical Design*, 2009a, vol. 15, no. 15, pp. 1717-1735. ISSN 1873-4286; 1381-6128.
- BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Past, Present and Future. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas e Biologicas / Sociedade Brasileira De Biofisica ...[Et Al.]*, 20081003, Jan, 2009b, vol. 42, no. 1, pp. 3-8. ISSN 1414-431X; 0100-879X.
- BURNSTOCK, G. Introduction: P2 Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2004, vol. 4, no. 8, pp. 793-803. ISSN 1568-0266; 1568-0266.
- BURNSTOCK, G. P2 Purinoceptors: Historical Perspective and Classification. *Ciba Foundation Symposium*, 1996, vol. 198, pp. 1-28; discussion 29-34. ISSN 0300-5208; 0300-5208.
- BURNSTOCK, G. Current State of Purinoceptor Research. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, Mar, 1995, vol. 69, no. 4, pp. 231-242. ISSN 0031-6865; 0031-6865.
- BURNSTOCK, G.; and KENNEDY, C. P2X Receptors in Health and Disease. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 2011, vol. 61, pp. 333-372. ISSN 1557-8925; 1054-3589.
- BURNSTOCK, G.; and KENNEDY, C. Is there a Basis for Distinguishing Two Types of P2-Purinoceptor?. *General Pharmacology*, 1985, vol. 16, no. 5, pp. 433-440. ISSN 0306-3623; 0306-3623.
- BURNSTOCK, G.; and KNIGHT, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. *International Review of Cytology*, 2004, vol. 240, pp. 31-304. ISSN 0074-7696; 0074-7696.
- BUSS, W. C.; STEPANEK, J. and QUEEN, S. A. Association of Tissue-Specific Changes in Translation Elongation After Cyclosporin with Changes in Elongation Factor 2 Phosphorylation. *Biochemical Pharmacology*, Oct 7, 1994, vol. 48, no. 7, pp. 1459-1469. ISSN 0006-2952; 0006-2952.

## C

CAMMER, W.; and NORTON, W. T. Disc Gel Electrophoresis of Myelin Proteins: New Observations on Development of the Intermediate Proteins (DM-20). *Brain Research*, Jun 18, 1976, vol. 109, no. 3, pp. 643-648. ISSN 0006-8993; 0006-8993.

CARGNELLO, M.; and ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, Mar, 2011, vol. 75, no. 1, pp. 50-83. ISSN 1098-5557; 1092-2172.

CARTIER, L.; CASTILLO, J. L. and VERDUGO, R. Effect of the Nucleus CMP Forte in 46 Patients with Progressive Spastic Paraparesis. Randomized and Blind Study. *Revista Medica De Chile*, May, 1996, vol. 124, no. 5, pp. 583-587. ISSN 0034-9887; 0034-9887.

CHARLTON, S. J., et al. PPADS and Suramin as Antagonists at Cloned P2Y- and P2U-Purinoceptors. *British Journal of Pharmacology*, Jun, 1996, vol. 118, no. 3, pp. 704-710. ISSN 0007-1188; 0007-1188.

CHATTOPADHYAY, S., et al. Cytokine Regulation of MMP-9 in Peripheral Glia: Implications for Pathological Processes and Pain in Injured Nerve. *Brain, Behavior, and Immunity*, 20061226, Jul, 2007, vol. 21, no. 5, pp. 561-568. ISSN 0889-1591; 0889-1591.

CHEN, D., et al. Expression of P2Y(6) Receptors in the Developing Mouse Skeletal Muscle and After Injury and Repair. *Journal of Anatomy*, 20110318, Jun, 2011, vol. 218, no. 6, pp. 643-651. ISSN 1469-7580; 0021-8782.

CHENG, C.; and ZOCHODNE, D. W. In Vivo Proliferation, Migration and Phenotypic Changes of Schwann Cells in the Presence of Myelinated Fibers. *Neuroscience*, 2002, vol. 115, no. 1, pp. 321-329. ISSN 0306-4522; 0306-4522.

CHRISTOFORI, G.; and SEMB, H. The Role of the Cell-Adhesion Molecule E-Cadherin as a Tumour-Suppressor Gene. *Trends in Biochemical Sciences*, Feb, 1999, vol. 24, no. 2, pp. 73-76. ISSN 0968-0004; 0968-0004.

COMMUNI, D.; and BOEYNAEMS, J. M. Receptors Responsive to Extracellular Pyrimidine Nucleotides. *Trends in Pharmacological Sciences*, Mar, 1997, vol. 18, no. 3, pp. 83-86. ISSN 0165-6147; 0165-6147.

COMMUNI, D., et al. Advances in Signalling by Extracellular Nucleotides. the Role and Transduction Mechanisms of P2Y Receptors. *Cellular Signalling*, Jun, 2000, vol. 12, no. 6, pp. 351-360. ISSN 0898-6568; 0898-6568.

COMMUNI, D., et al. Cloning and Functional Expression of a Human Uridine Nucleotide Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, Dec 29, 1995, vol. 270, no. 52, pp. 30849-30852. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

CRAWFORD, A. T., et al. E-Cadherin Expression in Postnatal Schwann Cells is Regulated by the cAMP-Dependent Protein Kinase a Pathway. *Glia*, Nov 15, 2008, vol. 56, no. 15, pp. 1637-1647. ISSN 1098-1136; 0894-1491.

CZUBAYKO, U.; and REISER, G. Desensitization of P2U Receptor in Neuronal Cell Line. Different Control by the Agonists ATP and UTP, as Demonstrated by Single-Cell Ca<sup>2+</sup> Responses. *The Biochemical Journal*, Nov 15, 1996, vol. 320 ( Pt 1), no. Pt 1, pp. 215-219. ISSN 0264-6021; 0264-6021.

## D

DEMESHKINA, N., et al. Novel Activity of Eukaryotic Translocase, eEF2: Dissociation of the 80S Ribosome into Subunits with ATP but Not with GTP. *Nucleic Acids Research*, 20070622, 2007, vol. 35, no. 14, pp. 4597-4607. ISSN 1362-4962; 0305-1048.

DERYCKE, L. D.; and BRACKE, M. E. N-Cadherin in the Spotlight of Cell-Cell Adhesion, Differentiation, Embryogenesis, Invasion and Signalling. *The International Journal of Developmental Biology*, 2004, vol. 48, no. 5-6, pp. 463-476. ISSN 0214-6282; 0214-6282.

DI VIRGILIO, F., et al. Nucleotide Receptors: An Emerging Family of Regulatory Molecules in Blood Cells. *Blood*, Feb 1, 2001, vol. 97, no. 3, pp. 587-600. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

DING, S.; and SACHS, F. Ion Permeation and Block of P2X(2) Purinoceptors: Single Channel Recordings. *The Journal of Membrane Biology*, Dec 1, 1999, vol. 172, no. 3, pp. 215-223. ISSN 0022-2631; 0022-2631.

DING, Z., et al. Inactivation of the Human P2Y<sub>12</sub> Receptor by Thiol Reagents Requires Interaction with both Extracellular Cysteine Residues, Cys17 and Cys270. *Blood*, 20030130, May 15, 2003, vol. 101, no. 10, pp. 3908-3914. ISSN 0006-4971; 0006-4971.

DOLMETSCH, R. E.; XU, K. and LEWIS, R. S. Calcium Oscillations Increase the Efficiency and Specificity of Gene Expression. *Nature*, Apr 30, 1998, vol. 392, no. 6679, pp. 933-936. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

## E

EBADI, M., et al. Neurotrophins and their Receptors in Nerve Injury and Repair. *Neurochemistry International*, Apr-May, 1997, vol. 30, no. 4-5, pp. 347-374. ISSN 0197-0186; 0197-0186.

EDWARDS, F. A.; GIBB, A. J. and COLQUHOUN, D. ATP Receptor-Mediated Synaptic Currents in the Central Nervous System. *Nature*, Sep 10, 1992, vol. 359, no. 6391, pp. 144-147. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

ERB, L., et al. Site-Directed Mutagenesis of P2U Purinoceptors. Positively Charged Amino Acids in Transmembrane Helices 6 and 7 Affect Agonist Potency and Specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, Mar 3, 1995, vol. 270, no. 9, pp. 4185-4188. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

ERB, L., et al. P2 Receptors: Intracellular Signaling. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 20060404, Aug, 2006, vol. 452, no. 5, pp. 552-562. ISSN 0031-6768; 0031-6768.

ERB, L., et al. An RGD Sequence in the P2Y(2) Receptor Interacts with Alpha(V)Beta(3) Integrins and is Required for G(o)-Mediated Signal Transduction. *The Journal of Cell Biology*, Apr 30, 2001, vol. 153, no. 3, pp. 491-501. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

ESPANA, J., et al. Beta-Amyloid Disrupts Activity-Dependent Gene Transcription Required for Memory through the CREB Coactivator CRTCL. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jul 14, 2010, vol. 30, no. 28, pp. 9402-9410. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; and HALL, A. Rho GTPases in Cell Biology. *Nature*, Dec 12, 2002, vol. 420, no. 6916, pp. 629-635. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

EVANS, R. J.; DERKACH, V. and SURPRENANT, A. ATP Mediates Fast Synaptic Transmission in Mammalian Neurons. *Nature*, Jun 11, 1992, vol. 357, no. 6378, pp. 503-505. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

## F

FAIRLESS, R.; FRAME, M. C. and BARNETT, S. C. N-Cadherin Differentially Determines Schwann Cell and Olfactory Ensheathing Cell Adhesion and Migration Responses upon Contact with Astrocytes. *Molecular and Cellular Neurosciences*, Feb, 2005, vol. 28, no. 2, pp. 253-263. ISSN 1044-7431; 1044-7431.

FANNON, A. M., et al. Novel E-Cadherin-Mediated Adhesion in Peripheral Nerve: Schwann Cell Architecture is Stabilized by Autotypic Adherens Junctions. *The Journal of*

*Cell Biology*, Apr, 1995, vol. 129, no. 1, pp. 189-202. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

FARNAES, L.; and DITZEL, H. J. Dissecting the Cellular Functions of Annexin XI using Recombinant Human Annexin XI-Specific Autoantibodies Cloned by Phage Display. *The Journal of Biological Chemistry*, 20030611, Aug 29, 2003, vol. 278, no. 35, pp. 33120-33126. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

FENRICH, K.; and GORDON, T. Canadian Association of Neuroscience Review: Axonal Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems--Current Issues and Advances. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, May, 2004, vol. 31, no. 2, pp. 142-156. ISSN 0317-1671; 0317-1671.

FERNANDEZ-VALLE, C.; WOOD, P. M. and BUNGE, M. B. Localization of Focal Adhesion Kinase in Differentiating Schwann cell/neuron Cultures. *Microscopy Research and Technique*, Jun 1, 1998, vol. 41, no. 5, pp. 416-430. ISSN 1059-910X; 1059-910X.

FIELDS, R. D.; and STEVENS-GRAHAM, B. New Insights into Neuron-Glia Communication. *Science (New York, N.Y.)*, Oct 18, 2002, vol. 298, no. 5593, pp. 556-562. ISSN 1095-9203; 0036-8075.

FISCHER, W., et al. Increase of Intracellular Ca<sup>2+</sup> by P2X and P2Y Receptor-Subtypes in Cultured Cortical Astroglia of the Rat. *Neuroscience*, 20090313, Jun 2, 2009, vol. 160, no. 4, pp. 767-783. ISSN 1873-7544; 0306-4522.

FOUNTAIN, S. J.; and BURNSTOCK, G. An Evolutionary History of P2X Receptors. *Purinergic Signalling*, 20081118, Sep, 2009, vol. 5, no. 3, pp. 269-272. ISSN 1573-9538.

FOURNIER, M. L., et al. Delayed Correlation of mRNA and Protein Expression in Rapamycin-Treated Cells and a Role for Ggc1 in Cellular Sensitivity to Rapamycin. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 20091110, Feb, 2010, vol. 9, no. 2, pp. 271-284. ISSN 1535-9484; 1535-9476.

FRAGOSO, G., et al. Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Interferes with Cell Shape Changes and Gene Expression Associated with Schwann Cell Myelination. *Experimental Neurology*, Sep, 2003, vol. 183, no. 1, pp. 34-46. ISSN 0014-4886; 0014-4886.

FRANKE, H., et al. P2 Receptor-Mediated Stimulation of the PI3-K/Akt-Pathway in Vivo. *Glia*, Aug 1, 2009, vol. 57, no. 10, pp. 1031-1045. ISSN 1098-1136; 0894-1491.

FREDHOLM, B. B., et al. Nomenclature and Classification of Purinoceptors. *Pharmacological*

*Reviews*, Jun, 1994, vol. 46, no. 2, pp. 143-156. ISSN 0031-6997; 0031-6997.

FU, S. Y.; and GORDON, T. The Cellular and Molecular Basis of Peripheral Nerve Regeneration. *Molecular Neurobiology*, Feb-Apr, 1997, vol. 14, no. 1-2, pp. 67-116. ISSN 0893-7648; 0893-7648.

FUMAGALLI, M., et al. Nucleotide-Mediated Calcium Signaling in Rat Cortical Astrocytes: Role of P2X and P2Y Receptors. *Glia*, Sep, 2003, vol. 43, no. 3, pp. 218-203. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

## G

GALLAI, V., et al. Effects of Uridine in the Treatment of Diabetic Neuropathy: An Electrophysiological Study. *Acta Neurologica Scandinavica*, Jul, 1992, vol. 86, no. 1, pp. 3-7. ISSN 0001-6314; 0001-6314.

GERASIMOVSKAYA, E. V., et al. Extracellular ATP is an autocrine/paracrine Regulator of Hypoxia-Induced Adventitial Fibroblast Growth. Signaling through Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2 and the Egr-1 Transcription Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 20020918, Nov 22, 2002, vol. 277, no. 47, pp. 44638-44650. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

GERKE, V.; and MOSS, S. E. Annexins: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, Apr, 2002, vol. 82, no. 2, pp. 331-371. ISSN 0031-9333; 0031-9333.

GOULD, R. M. Metabolic Organization of the Myelinating Schwann Cell. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990, vol. 605, pp. 44-54. ISSN 0077-8923; 0077-8923.

GOURINE, A. V.; WOOD, J. D. and BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling in Autonomic Control. *Trends in Neurosciences*, 20090408, May, 2009, vol. 32, no. 5, pp. 241-248. ISSN 0166-2236; 0166-2236.

GRAHAM, A., et al. Stimulation by the Nucleotides, ATP and UTP of Mitogen-Activated Protein Kinase in EAhy 926 Endothelial Cells. *British Journal of Pharmacology*, Mar, 1996, vol. 117, no. 6, pp. 1341-1347. ISSN 0007-1188; 0007-1188.

GREEN, A. C.; DOWDALL, M. J. and RICHARDSON, C. M. ATP Acting on P2Y Receptors Triggers Calcium Mobilization in Schwann Cells at the Neuroelectrocyte Junction in Skate. *Neuroscience*, Sep, 1997, vol. 80, no. 2, pp. 635-651. ISSN 0306-4522; 0306-4522.

GRIFFIN, J. W., et al. Schwann Cell Proliferation Following Lysolecithin-Induced Demyelination. *Journal of Neurocytology*, Jun, 1990, vol. 19,

no. 3, pp. 367-384. ISSN 0300-4864; 0300-4864.

GSCHWENDTNER, A., et al. Regulation, Cellular Localization, and Function of the p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR) during the Regeneration of Facial Motoneurons. *Molecular and Cellular Neurosciences*, Oct, 2003, vol. 24, no. 2, pp. 307-322. ISSN 1044-7431; 1044-7431.

## H

HAINES, J. D., et al. P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates Myelination. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 20071110, May, 2008, vol. 35, no. 1, pp. 23-33. ISSN 0895-8696; 0895-8696.

HALFAR, K., et al. Ras Controls Growth, Survival and Differentiation in the Drosophila Eye by Different Thresholds of MAP Kinase Activity. *Development (Cambridge, England)*, May, 2001, vol. 128, no. 9, pp. 1687-1696. ISSN 0950-1991; 0950-1991.

HANSEN, S. M.; BEREZIN, V. and BOCK, E. Signaling Mechanisms of Neurite Outgrowth Induced by the Cell Adhesion Molecules NCAM and N-Cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, Nov, 2008, vol. 65, no. 23, pp. 3809-3821. ISSN 1420-9071; 1420-682X.

HARDEN, T. K.; and LAZAROWSKI, E. R. Release of ATP and UTP from Astrocytoma Cells. *Progress in Brain Research*, 1999, vol. 120, pp. 135-143. ISSN 0079-6123; 0079-6123.

HARDEN, T. K.; LAZAROWSKI, E. R. and BOUCHER, R. C. Release, Metabolism and Interconversion of Adenine and Uridine Nucleotides: Implications for G Protein-Coupled P2 Receptor Agonist Selectivity. *Trends in Pharmacological Sciences*, Feb, 1997, vol. 18, no. 2, pp. 43-46. ISSN 0165-6147; 0165-6147.

HARRISINGH, M. C., et al. The Ras/Raf/ERK Signalling Pathway Drives Schwann Cell Dedifferentiation. *The EMBO Journal*, 20040708, Aug 4, 2004, vol. 23, no. 15, pp. 3061-3071. ISSN 0261-4189; 0261-4189.

HAYES, M. J., et al. Annexin-Actin Interactions. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, Aug, 2004, vol. 5, no. 8, pp. 571-576. ISSN 1398-9219; 1398-9219.

HEUMANN, R., et al. Changes of Nerve Growth Factor Synthesis in Nonneuronal Cells in Response to Sciatic Nerve Transection. *The Journal of Cell Biology*, Jun, 1987, vol. 104, no. 6, pp. 1623-1631. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

HOLTON, P. The Liberation of Adenosine Triphosphate on Antidromic Stimulation of Sensory Nerves. *The Journal of Physiology*, Mar 12, 1959, vol. 145, no. 3, pp. 494-504. ISSN 0022-3751; 0022-3751.

HOMS, J., et al. Schwann Cell Targeting Via Intrasciatic Injection of AAV8 as Gene Therapy Strategy for Peripheral Nerve Regeneration. *Gene Therapy*, 20110217, Jun, 2011, vol. 18, no. 6, pp. 622-630. ISSN 1476-5462; 0969-7128.

HOYER-HANSEN, M.; and JAATTELA, M. Connecting Endoplasmic Reticulum Stress to Autophagy by Unfolded Protein Response and Calcium. *Cell Death and Differentiation*, 20070706, Sep, 2007, vol. 14, no. 9, pp. 1576-1582. ISSN 1350-9047; 1350-9047.

HUWILER, A.; and PFEILSCHIFTER, J. Stimulation by Extracellular ATP and UTP of the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade and Proliferation of Rat Renal Mesangial Cells. *British Journal of Pharmacology*, Dec, 1994, vol. 113, no. 4, pp. 1455-1463. ISSN 0007-1188; 0007-1188.

## I

ILLES, P.; and RIBEIRO, J. A. Neuronal P2 Receptors of the Central Nervous System. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2004, vol. 4, no. 8, pp. 831-838. ISSN 1568-0266; 1568-0266.

IMADA, M.; SUEOKA, N. and RIFKIN, D. B. Clonal Sublines of Rat Neurotumor RT4 and Cell Differentiation. II. A Conversion Coupling of Tumorigenicity and a Glial Property. *Developmental Biology*, Sep, 1978, vol. 66, no. 1, pp. 109-116. ISSN 0012-1606; 0012-1606.

INBE, H., et al. Identification and Characterization of a Cell-Surface Receptor, P2Y<sub>15</sub>, for AMP and Adenosine. *The Journal of Biological Chemistry*, 20040304, May 7, 2004, vol. 279, no. 19, pp. 19790-19799. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

## J

JAMORA, C.; and FUCHS, E. Intercellular Adhesion, Signalling and the Cytoskeleton. *Nature Cell Biology*, Apr, 2002, vol. 4, no. 4, pp. E101-8. ISSN 1465-7392; 1465-7392.

JESSEN, K. R., et al. The Schwann Cell Precursor and its Fate: A Study of Cell Death and Differentiation during Gliogenesis in Rat Embryonic Nerves. *Neuron*, Mar, 1994, vol. 12, no. 3, pp. 509-527. ISSN 0896-6273; 0896-6273.

JESSEN, K. R.; and MIRSKY, R. Negative Regulation of Myelination: Relevance for Development, Injury, and Demyelinating Disease. *Glia*, Nov 1, 2008a, vol. 56, no. 14, pp. 1552-1565. ISSN 1098-1136; 0894-1491.

JESSEN, K. R.; and MIRSKY, R. Negative Regulation of Myelination: Relevance for Development, Injury, and Demyelinating Disease. *Glia*, Nov 1, 2008b, vol. 56, no. 14, pp. 1552-1565. ISSN 1098-1136; 0894-1491.

JESSEN, K. R.; and MIRSKY, R. The Origin and Development of Glial Cells in Peripheral Nerves. *Nature Reviews Neuroscience*, Sep, 2005, vol. 6, no. 9, pp. 671-682. ISSN 1471-003X; 1471-003X.

JESSEN, K. R.; and MIRSKY, R. Schwann Cell Precursors and their Development. *Glia*, 1991, vol. 4, no. 2, pp. 185-194. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. and MORGAN, L. Axonal Signals Regulate the Differentiation of Non-Myelin-Forming Schwann Cells: An Immunohistochemical Study of Galactocerebroside in Transected and Regenerating Nerves. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Oct, 1987, vol. 7, no. 10, pp. 3362-3369. ISSN 0270-6474; 0270-6474.

JIANG, Q., et al. A Mutational Analysis of Residues Essential for Ligand Recognition at the Human P2Y<sub>1</sub> Receptor. *Molecular Pharmacology*, Sep, 1997, vol. 52, no. 3, pp. 499-507. ISSN 0026-895X; 0026-895X.

JOHNSON, E. M., Jr; TANIUCHI, M. and DISTEFANO, P. S. Expression and Possible Function of Nerve Growth Factor Receptors on Schwann Cells. *Trends in Neurosciences*, Jul, 1988, vol. 11, no. 7, pp. 299-304. ISSN 0166-2236; 0166-2236.

JOOST, P.; and METHNER, A. Phylogenetic Analysis of 277 Human G-Protein-Coupled Receptors as a Tool for the Prediction of Orphan Receptor Ligands. *Genome Biology*, 20021017, Oct 17, 2002, vol. 3, no. 11, pp. RESEARCH0063. ISSN 1465-6914; 1465-6906.

## K

KANEMARU, K., et al. Regulation of Neurite Growth by Spontaneous Ca<sup>2+</sup> Oscillations in Astrocytes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Aug 15, 2007, vol. 27, no. 33, pp. 8957-8966. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

KARIN, M. The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-Activated Protein Kinases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of*

London. *Series B, Biological Sciences*, Feb 29, 1996, vol. 351, no. 1336, pp. 127-134. ISSN 0962-8436; 0962-8436.

KEILHOFF, G.; FANSA, H. and WOLF, G. Differences in Peripheral Nerve degeneration/regeneration between Wild-Type and Neuronal Nitric Oxide Synthase Knockout Mice. *Journal of Neuroscience Research*, May 15, 2002, vol. 68, no. 4, pp. 432-441. ISSN 0360-4012; 0360-4012.

KEMP, P. A.; SUGAR, R. A. and JACKSON, A. D. Nucleotide-Mediated Mucin Secretion from Differentiated Human Bronchial Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20040701, Oct, 2004, vol. 31, no. 4, pp. 446-455. ISSN 1044-1549; 1044-1549.

KIMELBERG, H. K. Functions of Mature Mammalian Astrocytes: A Current View. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, Feb, 2010, vol. 16, no. 1, pp. 79-106. ISSN 1089-4098; 1073-8584.

KIRYUSHKO, D.; BEREZIN, V. and BOCK, E. Regulators of Neurite Outgrowth: Role of Cell Adhesion Molecules. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Apr, 2004, vol. 1014, pp. 140-154. ISSN 0077-8923; 0077-8923.

KLOSE, J. Protein Mapping by Combined Isoelectric Focusing and Electrophoresis of Mouse Tissues. A Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals. *Humangenetik*, 1975, vol. 26, no. 3, pp. 231-243. ISSN 0018-7348; 0018-7348.

KOLES, L., et al. P2 Receptor Signaling in Neurons and Glial Cells of the Central Nervous System. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 2011, vol. 61, pp. 441-493. ISSN 1557-8925; 1054-3589.

## L

LAI, E.; TEODORO, T. and VOLCHUK, A. Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response. *Physiology (Bethesda, Md.)*, Jun, 2007, vol. 22, pp. 193-201. ISSN 1548-9213; 1548-9221.

LAKATOS, A.; FRANKLIN, R. J. and BARNETT, S. C. Olfactory Ensheathing Cells and Schwann Cells Differ in their in Vitro Interactions with Astrocytes. *Glia*, Dec, 2000, vol. 32, no. 3, pp. 214-225. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

LAZAROWSKI, E. R.; and BOUCHER, R. C. UTP as an Extracellular Signaling Molecule. *News in Physiological Sciences : An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, Feb,

2001, vol. 16, pp. 1-5. ISSN 0886-1714; 0886-1714.

LAZAROWSKI, E. R., et al. Direct Demonstration of Mechanically Induced Release of Cellular UTP and its Implication for Uridine Nucleotide Receptor Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, Sep 26, 1997, vol. 272, no. 39, pp. 24348-24354. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

LE MEE, S.; FROMIGUE, O. and MARIE, P. J. Sp1/Sp3 and the Myeloid Zinc Finger Gene MZF1 Regulate the Human N-Cadherin Promoter in Osteoblasts. *Experimental Cell Research*, Jan 1, 2005a, vol. 302, no. 1, pp. 129-142. ISSN 0014-4827; 0014-4827.

LE MEE, S.; FROMIGUE, O. and MARIE, P. J. Sp1/Sp3 and the Myeloid Zinc Finger Gene MZF1 Regulate the Human N-Cadherin Promoter in Osteoblasts. *Experimental Cell Research*, Jan 1, 2005b, vol. 302, no. 1, pp. 129-142. ISSN 0014-4827; 0014-4827.

LECONA, E., et al. Structural and Functional Characterization of Recombinant Mouse Annexin A11: Influence of Calcium Binding. *The Biochemical Journal*, Jul 15, 2003, vol. 373, no. Pt 2, pp. 437-449. ISSN 0264-6021; 0264-6021.

LEE, H. S.; and TOMAREV, S. I. Optimedin Induces Expression of N-Cadherin and Stimulates Aggregation of NGF-Stimulated PC12 Cells. *Experimental Cell Research*, 20060928, Jan 1, 2007, vol. 313, no. 1, pp. 98-108. ISSN 0014-4827; 0014-4827.

LEMKE, G.; and CHAO, M. Axons Regulate Schwann Cell Expression of the Major Myelin and NGF Receptor Genes. *Development (Cambridge, England)*, Mar, 1988, vol. 102, no. 3, pp. 499-504. ISSN 0950-1991; 0950-1991.

LEON, D.; HERVAS, C. and MIRAS-PORTUGAL, M. T. P2Y1 and P2X7 Receptors Induce calcium/calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation in Cerebellar Granule Neurons. *The European Journal of Neuroscience*, Jun, 2006, vol. 23, no. 11, pp. 2999-3013. ISSN 0953-816X; 0953-816X.

LETOURNEAU, P. C., et al. Interactions of Schwann Cells with Neurites and with Other Schwann Cells Involve the Calcium-Dependent Adhesion Molecule, N-Cadherin. *Journal of Neurobiology*, Oct, 1991, vol. 22, no. 7, pp. 707-720. ISSN 0022-3034; 0022-3034.

LI, Y.; and CAMACHO, P. Ca<sup>2+</sup>-Dependent Redox Modulation of SERCA 2b by ERp57. *The Journal of Cell Biology*, 20031229, Jan 5, 2004, vol. 164, no. 1, pp. 35-46. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

LI, Y.; and RAISMAN, G. Integration of Transplanted Cultured Schwann Cells into the Long Myelinated Fiber Tracts of the Adult Spinal Cord. *Experimental Neurology*, Jun, 1997, vol. 145, no. 2 Pt 1, pp. 397-411. ISSN 0014-4886; 0014-4886.

LI, Y., et al. Neuregulin Signaling through a PI3K/Akt/Bad Pathway in Schwann Cell Survival. *Molecular and Cellular Neurosciences*, Apr, 2001, vol. 17, no. 4, pp. 761-767. ISSN 1044-7431; 1044-7431.

LIU, G. J.; WERRY, E. L. and BENNETT, M. R. Secretion of ATP from Schwann Cells in Response to Uridine Triphosphate. *The European Journal of Neuroscience*, Jan, 2005, vol. 21, no. 1, pp. 151-160. ISSN 0953-816X; 0953-816X.

LU, A., et al. Blockade of AP1 Transactivation Abrogates the Abnormal Expression of Breast Cancer-Specific Gene 1 in Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 20020618, Aug 30, 2002, vol. 277, no. 35, pp. 31364-31372. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

LUSTIG, K. D., et al. Expression Cloning of an ATP Receptor from Mouse Neuroblastoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jun 1, 1993, vol. 90, no. 11, pp. 5113-5117. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

## M

MACHESKY, L. M.; and HALL, A. Role of Actin Polymerization and Adhesion to Extracellular Matrix in Rac- and Rho-Induced Cytoskeletal Reorganization. *The Journal of Cell Biology*, Aug 25, 1997, vol. 138, no. 4, pp. 913-926. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

MARTIN, A. C., et al. Effects of Arp2 and Arp3 Nucleotide-Binding Pocket Mutations on Arp2/3 Complex Function. *The Journal of Cell Biology*, Jan 17, 2005, vol. 168, no. 2, pp. 315-328. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

MARTIN, J. R.; and WEBSTER, H. D. Mitotic Schwann Cells in Developing Nerve: Their Changes in Shape, Fine Structure, and Axon Relationships. *Developmental Biology*, Jun, 1973, vol. 32, no. 2, pp. 417-431. ISSN 0012-1606; 0012-1606.

MARTINI, R.; and CARENINI, S. Formation and Maintenance of the Myelin Sheath in the Peripheral Nerve: Roles of Cell Adhesion Molecules and the Gap Junction Protein Connexin 32. *Microscopy Research and Technique*, Jun 1, 1998, vol. 41, no. 5, pp. 403-415. ISSN 1059-910X; 1059-910X.

MATHON, N. F., et al. Lack of Replicative Senescence in Normal Rodent Glia. *Science*

(New York, N.Y.), 20010118, Feb 2, 2001, vol. 291, no. 5505, pp. 872-875. ISSN 0036-8075; 0036-8075.

MEWS, M.; and MEYER, M. Modulation of Schwann Cell Phenotype by TGF-Beta 1: Inhibition of P0 mRNA Expression and Downregulation of the Low Affinity NGF Receptor. *Glia*, Jul, 1993, vol. 8, no. 3, pp. 208-217. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

MILNER, R., et al. Division of Labor of Schwann Cell Integrins during Migration on Peripheral Nerve Extracellular Matrix Ligands. *Developmental Biology*, May 15, 1997, vol. 185, no. 2, pp. 215-228. ISSN 0012-1606; 0012-1606.

MIRSKY, R., et al. Regulation of Genes Involved in Schwann Cell Development and Differentiation. *Progress in Brain Research*, 2001a, vol. 132, pp. 3-11. ISSN 0079-6123; 0079-6123.

MIRSKY, R., et al. Regulation of Genes Involved in Schwann Cell Development and Differentiation. *Progress in Brain Research*, 2001b, vol. 132, pp. 3-11. ISSN 0079-6123; 0079-6123.

MITCHELL, L. S., et al. Expression of Myelin Protein Gene Transcripts by Schwann Cells of Regenerating Nerve. *Journal of Neuroscience Research*, Oct, 1990, vol. 27, no. 2, pp. 125-135. ISSN 0360-4012; 0360-4012.

MONASTYRSKAYA, K.; BABIYCHUK, E. B. and DRAEGER, A. The Annexins: Spatial and Temporal Coordination of Signaling Events during Cellular Stress. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 20090421, Aug, 2009, vol. 66, no. 16, pp. 2623-2642. ISSN 1420-9071; 1420-682X.

MONKS, D. A., et al. N-Cadherin is Regulated by Gonadal Steroids in the Adult Hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20010123, Jan 30, 2001, vol. 98, no. 3, pp. 1312-1316. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

MOORE, D., et al. Immunohistochemical Localization of the P2Y1 Purinergic Receptor in Alzheimer's Disease. *Neuroreport*, Nov 27, 2000, vol. 11, no. 17, pp. 3799-3803. ISSN 0959-4965; 0959-4965.

MOORE, D. J., et al. Expression Pattern of Human P2Y Receptor Subtypes: A Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Study. *Biochimica Et Biophysica Acta*, Oct 31, 2001, vol. 1521, no. 1-3, pp. 107-119. ISSN 0006-3002; 0006-3002.

MORSE, D. M.; SMULLEN, J. L. and DAVIS, C. W. Differential Effects of UTP, ATP, and Adenosine on Ciliary Activity of Human Nasal Epithelial

Cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, Jun, 2001, vol. 280, no. 6, pp. C1485-97. ISSN 0363-6143; 0363-6143.

MORTZ, E., et al. Improved Silver Staining Protocols for High Sensitivity Protein Identification using Matrix-Assisted Laser desorption/ionization-Time of Flight Analysis. *Proteomics*, Nov, 2001, vol. 1, no. 11, pp. 1359-1363. ISSN 1615-9853; 1615-9853.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, Dec 16, 1983, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63. ISSN 0022-1759; 0022-1759.

MUGNAINI, E.; and SCHNAPP, B. Possible Role of Zonula Occludens of the Myelin Sheath in Demyelinating Conditions. *Nature*, Oct 25, 1974, vol. 251, no. 5477, pp. 725-727. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

MULLER, D. Treatment of Neuropathic Pain Syndrome. Results of an Open Study on the Efficacy of a Pyrimidine Nucleotide Preparation. *Fortschritte Der Medizin.Originalien*, Dec 5, 2002, vol. 120, no. 4, pp. 131-133.

## N

NAGARAJAN, R., et al. EGR2 Mutations in Inherited Neuropathies Dominant-Negatively Inhibit Myelin Gene Expression. *Neuron*, May, 2001, vol. 30, no. 2, pp. 355-368. ISSN 0896-6273; 0896-6273.

NAKAMURA, T., et al. ATP Induces Contraction Mediated by the P2Y(2) Receptor in Rat Intestinal Subepithelial Myofibroblasts. *European Journal of Pharmacology*, 20110204, Apr 25, 2011, vol. 657, no. 1-3, pp. 152-158. ISSN 1879-0712; 0014-2999.

NAVARRO, X. Chapter 27: Neural Plasticity After Nerve Injury and Regeneration. *International Review of Neurobiology*, 2009, vol. 87, pp. 483-505. ISSN 0074-7742; 0074-7742.

NAVE, K. A. Myelination and the Trophic Support of Long Axons. *Nature Reviews. Neuroscience*, 20100310, Apr, 2010, vol. 11, no. 4, pp. 275-283. ISSN 1471-0048; 1471-003X.

NEARY, J. T., et al. P2 Receptor Signalling, Proliferation of Astrocytes, and Expression of Molecules Involved in Cell-Cell Interactions. *Novartis Foundation Symposium*, 2006, vol. 276, pp. 131-43; discussion 143-7, 233-7, 275-81. ISSN 1528-2511; 1528-2511.

NEUGEBAUER, K. M., et al. N-Cadherin, NCAM, and Integrins Promote Retinal Neurite

Outgrowth on Astrocytes in Vitro. *The Journal of Cell Biology*, Sep, 1988, vol. 107, no. 3, pp. 1177-1187. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

NICHOLAS, R. A., et al. Pharmacological and Second Messenger Signalling Selectivities of Cloned P2Y Receptors. *Journal of Autonomic Pharmacology*, Dec, 1996, vol. 16, no. 6, pp. 319-323. ISSN 0144-1795; 0144-1795.

NIEBER, K.; POELCHEN, W. and ILLES, P. Role of ATP in Fast Excitatory Synaptic Potentials in Locus Coeruleus Neurons of the Rat. *British Journal of Pharmacology*, Oct, 1997, vol. 122, no. 3, pp. 423-430. ISSN 0007-1188; 0007-1188.

NORRIS, A. D.; DYER, J. O. and LUNDQUIST, E. A. The Arp2/3 Complex, UNC-115/abLIM, and UNC-34/Enabled Regulate Axon Guidance and Growth Cone Filopodia Formation in *Caenorhabditis Elegans*. *Neural Development*, 20091002, Oct 2, 2009, vol. 4, pp. 38. ISSN 1749-8104; 1749-8104.

## O

ODA, H.; TSUKITA, S. and TAKEICHI, M. Dynamic Behavior of the Cadherin-Based Cell-Cell Adhesion System during *Drosophila* Gastrulation. *Developmental Biology*, Nov 15, 1998, vol. 203, no. 2, pp. 435-450. ISSN 0012-1606; 0012-1606.

O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, May 25, 1975, vol. 250, no. 10, pp. 4007-4021. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

OGATA, T., et al. Opposing Extracellular Signal-Regulated Kinase and Akt Pathways Control Schwann Cell Myelination. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jul 28, 2004, vol. 24, no. 30, pp. 6724-6732. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

OKAMURA, K., et al. Cadherin Activity is Required for Activity-Induced Spine Remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 20041129, Dec 6, 2004, vol. 167, no. 5, pp. 961-972. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

## P

PANDA, D. K., et al. The Transcription Factor SOX9 Regulates Cell Cycle and Differentiation Genes in Chondrocytic CFK2 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 20010820, Nov 2, 2001, vol. 276, no. 44, pp. 41229-41236. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

PANENKA, W., et al. P2X7-Like Receptor Activation in Astrocytes Increases Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression

Via Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Sep 15, 2001, vol. 21, no. 18, pp. 7135-7142. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

PANKRATOV, Y., et al. A Purinergic Component of the Excitatory Postsynaptic Current Mediated by P2X Receptors in the CA1 Neurons of the Rat Hippocampus. *The European Journal of Neuroscience*, Dec, 1998, vol. 10, no. 12, pp. 3898-3902. ISSN 0953-816X; 0953-816X.

PANKRATOV, Y., et al. Vesicular Release of ATP at Central Synapses. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 20060426, Aug, 2006, vol. 452, no. 5, pp. 589-597. ISSN 0031-6768; 0031-6768.

PARKINSON, D. B., et al. C-Jun is a Negative Regulator of Myelination. *The Journal of Cell Biology*, May 19, 2008, vol. 181, no. 4, pp. 625-637. ISSN 1540-8140; 0021-9525.

PARKINSON, D. B., et al. Krox-20 Inhibits Jun-NH2-Terminal kinase/c-Jun to Control Schwann Cell Proliferation and Death. *The Journal of Cell Biology*, Feb 2, 2004, vol. 164, no. 3, pp. 385-394. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

PEDRAZA, L.; HUANG, J. K. and COLMAN, D. R. Organizing Principles of the Axoglial Apparatus. *Neuron*, May, 2001, vol. 30, no. 2, pp. 335-344. ISSN 0896-6273; 0896-6273.

PEREZ, T. D.; and NELSON, W. J. Cadherin Adhesion: Mechanisms and Molecular Interactions. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2004, vol. (165), no. 165, pp. 3-21. ISSN 0171-2004; 0171-2004.

PERTUSA, M., et al. Transcriptional Control of Cholesterol Biosynthesis in Schwann Cells by Axonal Neuregulin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 20070725, Sep 28, 2007, vol. 282, no. 39, pp. 28768-28778. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

PHILLIPS, J. H.; and MORTON, A. G. Adenosine Triphosphate in the Bovine Chromaffin Granule. *Journal De Physiologie*, 1978, vol. 74, no. 5, pp. 503-508. ISSN 0021-7948; 0021-7948.

PLOTNIKOV, A., et al. The MAPK Cascades: Signaling Components, Nuclear Roles and Mechanisms of Nuclear Translocation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20101216, Sep, 2011, vol. 1813, no. 9, pp. 1619-1633. ISSN 0006-3002; 0006-3002.

POLIAK, S.; and PELES, E. The Local Differentiation of Myelinated Axons at Nodes of Ranvier. *Nature Reviews Neuroscience*, Dec, 2003, vol. 4, no. 12, pp. 968-980. ISSN 1471-003X; 1471-003X.

POTUCEK, Y. D.; CRAIN, J. M. and WATTERS, J. J. Purinergic Receptors Modulate MAP Kinases and Transcription Factors that Control Microglial Inflammatory Gene Expression. *Neurochemistry International*, 20060602, Jul, 2006, vol. 49, no. 2, pp. 204-214. ISSN 0197-0186; 0197-0186.

PRILLER, J., et al. Calcitonin Gene-Related Peptide and ATP Induce Immediate Early Gene Expression in Cultured Rat Microglial Cells. *Glia*, Dec, 1995, vol. 15, no. 4, pp. 447-457. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

PRIMM, T. P.; WALKER, K. W. and GILBERT, H. F. Facilitated Protein Aggregation. Effects of Calcium on the Chaperone and Anti-Chaperone Activity of Protein Disulfide-Isomerase. *The Journal of Biological Chemistry*, Dec 27, 1996, vol. 271, no. 52, pp. 33664-33669. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

## Q

QUINTAS, C., et al. P2Y Receptors on Astrocytes and Microglia Mediate Opposite Effects in Astroglial Proliferation. *Purinergic Signalling*, 20110511, Jun, 2011, vol. 7, no. 2, pp. 251-263. ISSN 1573-9546.

## R

RAFFAGHELLO, L., et al. The P2X7 Receptor Sustains the Growth of Human Neuroblastoma Cells through a Substance P-Dependent Mechanism. *Cancer Research*, Jan 15, 2006, vol. 66, no. 2, pp. 907-914. ISSN 0008-5472; 0008-5472.

RIDLEY, A. J., et al. Ras-Mediated Cell Cycle Arrest is Altered by Nuclear Oncogenes to Induce Schwann Cell Transformation. *The EMBO Journal*, Jun, 1988, vol. 7, no. 6, pp. 1635-1645. ISSN 0261-4189; 0261-4189.

RYAZANOV, A. G.; and SPIRIN, A. S. Phosphorylation of Elongation Factor 2: A Key Mechanism Regulating Gene Expression in Vertebrates. *The New Biologist*, Oct, 1990, vol. 2, no. 10, pp. 843-850. ISSN 1043-4674; 1043-4674.

## S

SAHER, G., et al. Cholesterol Regulates the Endoplasmic Reticulum Exit of the Major Membrane Protein P0 Required for Peripheral Myelin Compaction. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, May 13, 2009, vol. 29, no. 19, pp. 6094-6104. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

SALZER, J. L. Switching Myelination on and Off. *The Journal of Cell Biology*, May 19, 2008, vol. 181, no. 4, pp. 575-577. ISSN 1540-8140; 0021-9525.

SCHUH, R., et al. Molecular Cloning of the Mouse Cell Adhesion Molecule Uvomorulin: CDNA Contains a B1-Related Sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Mar, 1986, vol. 83, no. 5, pp. 1364-1368. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

SCHWIEBERT, E. M.; and ZSEMBERY, A. Extracellular ATP as a Signaling Molecule for Epithelial Cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, Sep 2, 2003, vol. 1615, no. 1-2, pp. 7-32. ISSN 0006-3002; 0006-3002.

SCODELARO BILBAO, P.; BOLAND, R. and SANTILLAN, G. ATP Modulates Transcription Factors through P2Y2 and P2Y4 Receptors Via PKC/MAPKs and PKC/Src Pathways in MCF-7 Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 20091110, Feb 1, 2010, vol. 494, no. 1, pp. 7-14. ISSN 1096-0384; 0003-9861.

SEMINARIO-VIDAL, L., et al. Thrombin Promotes Release of ATP from Lung Epithelial Cells through Coordinated Activation of Rho- and Ca<sup>2+</sup>-Dependent Signaling Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 20090512, Jul 31, 2009, vol. 284, no. 31, pp. 20638-20648. ISSN 1083-351X; 0021-9258.

SEYE, C. I., et al. The P2Y2 Nucleotide Receptor Mediates Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression through Interaction with VEGF Receptor-2 (KDR/Flk-1). *The Journal of Biological Chemistry*, 20040602, Aug 20, 2004, vol. 279, no. 34, pp. 35679-35686. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

SHAULIAN, E.; and KARIN, M. AP-1 in Cell Proliferation and Survival. *Oncogene*, Apr 30, 2001, vol. 20, no. 19, pp. 2390-2400. ISSN 0950-9232; 0950-9232.

SILINSKY, E. M.; GERZANICH, V. and VANNER, S. M. ATP Mediates Excitatory Synaptic Transmission in Mammalian Neurones. *British Journal of Pharmacology*, Aug, 1992, vol. 106, no. 4, pp. 762-763. ISSN 0007-1188; 0007-1188.

SNIPES, G. J., et al. Characterization of a Novel Peripheral Nervous System Myelin Protein (PMP-22/SR13). *The Journal of Cell Biology*, Apr, 1992, vol. 117, no. 1, pp. 225-238. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

SOBUE, G.; and PLEASURE, D. Schwann Cell Galactocerebroside Induced by Derivatives of Adenosine 3',5'-Monophosphate. *Science (New York, N.Y.)*, Apr 6, 1984, vol. 224, no. 4644, pp. 72-74. ISSN 0036-8075; 0036-8075.

SPENCER, P. S., et al. The Perineurial Window-- a New Model of Focal Demyelination and Remyelination. *Brain Research*, Oct 17, 1975, vol. 96, no. 2, pp. 323-329. ISSN 0006-8993; 0006-8993.

STOLL, G.; and MULLER, H. W. Nerve Injury, Axonal Degeneration and Neural Regeneration: Basic Insights. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, Apr, 1999, vol. 9, no. 2, pp. 313-325. ISSN 1015-6305; 1015-6305.

STOLL, G.; TRAPP, B. D. and GRIFFIN, J. W. Macrophage Function during Wallerian Degeneration of Rat Optic Nerve: Clearance of Degenerating Myelin and Ia Expression. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jul, 1989, vol. 9, no. 7, pp. 2327-2335. ISSN 0270-6474; 0270-6474.

SULAIMAN, O. A.; and GORDON, T. Effects of Short- and Long-Term Schwann Cell Denervation on Peripheral Nerve Regeneration, Myelination, and Size. *Glia*, Dec, 2000, vol. 32, no. 3, pp. 234-246. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

SUTER, U.; and SCHERER, S. S. Disease Mechanisms in Inherited Neuropathies. *Nature Reviews.Neuroscience*, Sep, 2003, vol. 4, no. 9, pp. 714-726. ISSN 1471-003X; 1471-003X.

## T

TAKAHASHI, M.; and OSUMI, N. Identification of a Novel Type II Classical Cadherin: Rat cadherin19 is Expressed in the Cranial Ganglia and Schwann Cell Precursors during Development. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, Jan, 2005, vol. 232, no. 1, pp. 200-208. ISSN 1058-8388; 1058-8388.

TAKEICHI, M. The Cadherin Superfamily in Neuronal Connections and Interactions. *Nature Reviews.Neuroscience*, 20061129, Jan, 2007, vol. 8, no. 1, pp. 11-20. ISSN 1471-003X; 1471-003X.

TAMURA, K., et al. Structure-Function Analysis of Cell Adhesion by Neural (N-) Cadherin. *Neuron*, Jun, 1998, vol. 20, no. 6, pp. 1153-1163. ISSN 0896-6273; 0896-6273.

TANOS, T., et al. Phosphorylation of c-Fos by Members of the p38 MAPK Family. Role in the AP-1 Response to UV Light. *The Journal of Biological Chemistry*, 20050210, May 13, 2005, vol. 280, no. 19, pp. 18842-18852. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

TOMASELLI, K. J., et al. N-Cadherin and Integrins: Two Receptor Systems that Mediate Neuronal Process Outgrowth on Astrocyte Surfaces. *Neuron*, Mar, 1988, vol. 1, no. 1, pp. 33-43. ISSN 0896-6273; 0896-6273.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T. and GORDON, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Sep, 1979, vol. 76, no. 9, pp. 4350-4354. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

TOZAKI-SAITOH, H.; TSUDA, M. and INOUE, K. Role of Purinergic Receptors in CNS Function and Neuroprotection. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 2011, vol. 61, pp. 495-528. ISSN 1557-8925; 1054-3589.

TRAN, M. D.; and NEARY, J. T. Purinergic Signaling Induces Thrombospondin-1 Expression in Astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20060605, Jun 13, 2006, vol. 103, no. 24, pp. 9321-9326. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

TRAN, M. D.; WANNER, I. B. and NEARY, J. T. Purinergic Receptor Signaling Regulates N-Cadherin Expression in Primary Astrocyte Cultures. *Journal of Neurochemistry*, 20080107, Apr, 2008a, vol. 105, no. 1, pp. 272-286. ISSN 1471-4159; 0022-3042.

TRAN, M. D.; WANNER, I. B. and NEARY, J. T. Purinergic Receptor Signaling Regulates N-Cadherin Expression in Primary Astrocyte Cultures. *Journal of Neurochemistry*, 20080107, Apr, 2008b, vol. 105, no. 1, pp. 272-286. ISSN 1471-4159; 0022-3042.

TRAPP, B. D., et al. Co-Localization of the Myelin-Associated Glycoprotein and the Microfilament Components, F-Actin and Spectrin, in Schwann Cells of Myelinated Nerve Fibres. *Journal of Neurocytology*, Feb, 1989, vol. 18, no. 1, pp. 47-60. ISSN 0300-4864; 0300-4864.

TU, M. T., et al. P2Y(2) Receptor-Mediated Proliferation of C(6) Glioma Cells Via Activation of Ras/Raf/MEK/MAPK Pathway. *British Journal of Pharmacology*, Apr, 2000, vol. 129, no. 7, pp. 1481-1489. ISSN 0007-1188; 0007-1188.

TURJANSKI, A. G.; VAQUE, J. P. and GUTKIND, J. S. MAP Kinases and the Control of Nuclear Events. *Oncogene*, May 14, 2007, vol. 26, no. 22, pp. 3240-3253. ISSN 0950-9232; 0950-9232.

## V

VALERA, S., et al. A New Class of Ligand-Gated Ion Channel Defined by P2x Receptor for Extracellular ATP. *Nature*, Oct 6, 1994, vol. 371, no. 6497, pp. 516-519. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

VANDERSTOCKEN, G., et al. P2Y2 Receptor Regulates VCAM-1 Membrane and Soluble Forms and Eosinophil Accumulation during Lung Inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 20100818, Sep 15, 2010, vol. 185, no. 6, pp. 3702-3707. ISSN 1550-6606; 0022-1767.

VARGAS, M. E.; and BARRES, B. A. Why is Wallerian Degeneration in the CNS so Slow?. *Annual Review of Neuroscience*, 2007, vol. 30, pp. 153-179. ISSN 0147-006X; 0147-006X.

VERKHRATSKY, A.; KRISHTAL, O. A. and BURNSTOCK, G. Purinoceptors on Neuroglia. *Molecular Neurobiology*, 20090313, Jun, 2009, vol. 39, no. 3, pp. 190-208. ISSN 0893-7648; 0893-7648.

VON KUGELGEN, I. Pharmacological Profiles of Cloned Mammalian P2Y-Receptor Subtypes. *Pharmacology & Therapeutics*, 20051028, Jun, 2006, vol. 110, no. 3, pp. 415-432. ISSN 0163-7258; 0163-7258.

VON KUGELGEN, I.; and HARDEN, T. K. Molecular Pharmacology, Physiology, and Structure of the P2Y Receptors. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 2011, vol. 61, pp. 373-415. ISSN 1557-8925; 1054-3589.

VRBOVA, G., et al. Chemical Communication between Regenerating Motor Axons and Schwann Cells in the Growth Pathway. *The European Journal of Neuroscience*, 20090728, Aug, 2009, vol. 30, no. 3, pp. 366-375. ISSN 1460-9568; 0953-816X.

## W

WANNER, I. B., et al. Role of N-Cadherin in Schwann Cell Precursors of Growing Nerves. *Glia*, Oct, 2006a, vol. 54, no. 5, pp. 439-459. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

WANNER, I. B., et al. Role of N-Cadherin in Schwann Cell Precursors of Growing Nerves. *Glia*, Oct, 2006b, vol. 54, no. 5, pp. 439-459. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

WANNER, I. B., et al. Role of N-Cadherin in Schwann Cell Precursors of Growing Nerves. *Glia*, Oct, 2006c, vol. 54, no. 5, pp. 439-459. ISSN 0894-1491; 0894-1491.

WANNER, I. B.; and WOOD, P. M. N-Cadherin Mediates Axon-Aligned Process Growth and Cell-Cell Interaction in Rat Schwann Cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, May 15, 2002, vol. 22, no. 10, pp. 4066-4079. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

WATTIG, B., et al. Enhancement of Nerve Fibre Regeneration by Nucleotides After Peripheral Nerve Crush Damage. Electrophysiologic and

Morphometric Investigations. *Arzneimittel-Forschung*, Sep, 1992a, vol. 42, no. 9, pp. 1075-1078. ISSN 0004-4172; 0004-4172.

WATTIG, B., et al. Acceleration of Nerve and Muscle Regeneration by Administration of Nucleotides--Electroneurophysiological and Morphometrical Investigations. *Acta Histochemica.Supplementband*, 1992b, vol. 42, pp. 333-339. ISSN 0567-7556; 0567-7556.

WEBSTER, H. D. Myelin Injury and Repair. *Advances in Neurology*, 1993, vol. 59, pp. 67-73. ISSN 0091-3952; 0091-3952.

WEINER, J. A., et al. Regulation of Schwann Cell Morphology and Adhesion by Receptor-Mediated Lysophosphatidic Acid Signaling. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Sep 15, 2001, vol. 21, no. 18, pp. 7069-7078. ISSN 1529-2401; 0270-6474.

WEISBLUM, B.; and HAENSSLER, E. Fluorometric Properties of the Bibenzimidazole Derivative Hoechst 33258, a Fluorescent Probe Specific for AT Concentration in Chromosomal DNA. *Chromosoma*, 1974, vol. 46, no. 3, pp. 255-260. ISSN 0009-5915; 0009-5915.

WHITMARSH, A. J.; and DAVIS, R. J. Transcription Factor AP-1 Regulation by Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, Oct, 1996, vol. 74, no. 10, pp. 589-607. ISSN 0946-2716; 0946-2716.

WIERASZKO, A.; and SEYFRIED, T. N. Increased Amount of Extracellular ATP in Stimulated Hippocampal Slices of Seizure Prone Mice. *Neuroscience Letters*, Dec 4, 1989, vol. 106, no. 3, pp. 287-293. ISSN 0304-3940; 0304-3940.

WILBY, M. J., et al. N-Cadherin Inhibits Schwann Cell Migration on Astrocytes. *Molecular and Cellular Neurosciences*, Jul, 1999, vol. 14, no. 1, pp. 66-84. ISSN 1044-7431; 1044-7431.

WOODHOO, A., et al. Notch Controls Embryonic Schwann Cell Differentiation, Postnatal Myelination and Adult Plasticity. *Nature Neuroscience*, 20090614, Jul, 2009, vol. 12, no. 7, pp. 839-847. ISSN 1546-1726; 1097-6256.

WOODHOO, A.; and SOMMER, L. Development of the Schwann Cell Lineage: From the Neural Crest to the Myelinated Nerve. *Glia*, Nov 1, 2008, vol. 56, no. 14, pp. 1481-1490. ISSN 1098-1136; 0894-1491.

WU, S., et al. Ultraviolet Light Inhibits Translation through Activation of the Unfolded Protein Response Kinase PERK in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of*

*Biological Chemistry*, 20020304, May 17, 2002, vol. 277, no. 20, pp. 18077-18083. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

## Y

YAMAUCHI, J.; CHAN, J. R. and SHOOTER, E. M. Neurotrophins Regulate Schwann Cell Migration by Activating Divergent Signaling Pathways Dependent on Rho GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20040525, Jun 8, 2004, vol. 101, no. 23, pp. 8774-8779. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

YANG, C. Z., et al. Astrocyte and Neuron Intone through Glutamate. *Neurochemical Research*, 20080619, Dec, 2008, vol. 33, no. 12, pp. 2480-2486. ISSN 1573-6903; 0364-3190.

YANG, Z. Z., et al. Physiological Functions of Protein Kinase B/Akt. *Biochemical Society Transactions*, Apr, 2004, vol. 32, no. Pt 2, pp. 350-354. ISSN 0300-5127; 0300-5127.

YAP, A. S.; BRIEHER, W. M. and GUMBINER, B. M. Molecular and Functional Analysis of Cadherin-Based Adherens Junctions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1997, vol. 13, pp. 119-146. ISSN 1081-0706; 1081-0706.

YU, W. M., et al. Disruption of Laminin in the Peripheral Nervous System Impedes Nonmyelinating Schwann Cell Development and Impairs Nociceptive Sensory Function. *Glia*, Jun, 2009, vol. 57, no. 8, pp. 850-859. ISSN 1098-1136; 0894-1491.

## Z

ZIMMERMANN, H.; and BRAUN, N. Ecto-Nucleotidases--Molecular Structures, Catalytic Properties, and Functional Roles in the Nervous System. *Progress in Brain Research*, 1999, vol. 120, pp. 371-385. ISSN 0079-6123; 0079-6123.

ZOCHODNE, D. W. The Microenvironment of Injured and Regenerating Peripheral Nerves. *Muscle & Nerve.Supplement*, 2000, vol. 9, pp. S33-8.

ZORICK, T. S., et al. Krox-20 Controls SCIP Expression, Cell Cycle Exit and Susceptibility to Apoptosis in Developing Myelinating Schwann Cells. *Development (Cambridge, England)*, Apr, 1999, vol. 126, no. 7, pp. 1397-1406. ISSN 0950-1991; 0950-1991.