

INTRODUCCIÓN

1. LA MUERTE NEURONAL FISIOLÓGICA

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso (SN) de los seres vivos vertebrados, acontece un proceso de muerte celular de grandes dimensiones aparentemente específico del SN, que indudablemente constituye un fenómeno muy llamativo y de gran relevancia. En las diferentes áreas del SN, tanto periférico (SNP) como central (SNC), aproximadamente la mitad de las neuronas inician una cascada de acontecimientos celulares y moleculares que conllevan la regresión y, en última instancia, la degeneración y muerte neuronal. La magnitud de esta pérdida celular es tal que no puede ser explicada en función de una cierta imprecisión ocasional a nivel genético y/o epigenético.

Este tipo de muerte celular normalmente ocurre en un estadio relativamente tardío de la maduración, a menudo días o semanas después de la génesis neuronal, tras la proyección de axones a las respectivas dianas de inervación, y una vez ya se ha iniciado la expresión fenotípica de muchas de las características de un tipo neuronal determinado. A lo largo de los años este fenómeno ha sido denominado de múltiples maneras: muerte fisiológica, probabilística, epigenética, programada, histogenética, etc. A partir de ahora, nos referiremos a él como *muerte neuronal fisiológica*.

Intuitivamente, el proceso de muerte neuronal fisiológica resulta un tanto paradójico ya que, en general, el desarrollo de un organismo vivo es un ejemplo de construcción en base a una proliferación celular en relación con el crecimiento y maduración de tejidos y órganos, así como de sus

funciones bioquímicas y fisiológicas. Por otra parte, casi en cualquier otra circunstancia en la vida de un organismo, la muerte celular masiva es considerada como un ejemplo inequívoco de un proceso patológico. Sin embargo, la muerte celular masiva forma parte del desarrollo normal de una gran variedad de células, tejidos y órganos (revisado por: Snow, 1987).

Se pueden diferenciar distintas variantes de muerte celular masiva durante el desarrollo embrionario: a) la *muerte celular metamórfica*, que permite eliminar células, tejidos y órganos con una función transitoria durante el desarrollo embrionario, como por ejemplo la cola de los renacuajos; b) la *muerte celular filogenética*, que contribuye a la eliminación de determinadas estructuras que han perdido la que era su función en un ancestro evolutivo. Este es el caso del mesonefros y el pronefros o la cola humana; c) la *muerte celular morfogenética*, que a través de una pérdida de células durante el desarrollo embrionario origina patrones estructurales a nivel corporal, de órganos y de tejidos típicos de determinadas especies. Un ejemplo muy representativo es la formación de los dígitos en muchos vertebrados terrestres mediante la pérdida espacialmente selectiva del tejido interdigital o, a nivel del SN, la creación de distribuciones celulares específicas de regiones así como de espacios, canales u orificios; d) por último, la *muerte celular dimorfosexual* participa en la generación del dimorfismo sexual, aparentemente sometida a una regulación hormonal. El fenómeno de la muerte neuronal fisiológica, además de ser específico del SN, reúne toda una serie de características propias que, como se detallará a continuación, lo hacen especialmente interesante y, al mismo tiempo, diferenciado respecto a esos otros tipos de muerte celular masiva que suceden durante el desarrollo embrionario de los seres vivos.

1.1 Definición de muerte neuronal fisiológica

La descripción inicial del proceso de muerte neuronal fisiológica se debe a los estudios cuantitativos detallados de Viktor Hamburger y Rita Levi-Montalcini (1949) en embriones de pollo. En sus primeros trabajos estos neurobiólogos demostraron que durante los días 5 y 6 del desarrollo embrionario (E5-E6) del pollo se produce la degeneración de un gran número de neuronas en los ganglios espinales, cervicales y torácicos. Estudios posteriores han demostrado que la muerte neuronal fisiológica afecta a un amplio grupo de poblaciones neuronales, tanto en el SNC como en el SNP.

La proporción de neuronas que mueren es variable en las diferentes regiones del SN, oscilando según la población neuronal estudiada entre el 20 y el 80%. Por ejemplo, en el caso concreto de las MTN's de la médula espinal, diversos autores han estimado que la muerte neuronal fisiológica alcanza dimensiones del 50-60% (Lance-Jones, 1982; Oppenheim, 1986; Oppenheim et al., 1986).

Antes de iniciarse el proceso de muerte neuronal fisiológica, las neuronas deben alcanzar un estadio de diferenciación relativamente avanzado. La mayoría de las neuronas que mueren han migrado previamente a sus correspondientes posiciones definitivas, han desarrollado procesos dendríticos y axonales, han recibido algunas conexiones sinápticas de sus aferencias y han enviado axones a sus dianas de innervación. Un buen ejemplo lo constituye la muerte de las MTN's espinales en el embrión de pollo, cuyos precursores celulares indiferenciados deben primero emprender una vía de diferenciación epidérmica y, a continuación, iniciar su diferenciación neuronal hasta que se transforman en MTN's funcionales (revisado por: Oppenheim, 1991). De hecho, la muerte neuronal fisiológica no se inicia hasta que los axones

de las neuronas han alcanzado sus territorios de inervación respectivos (Hamburger y Oppenheim, 1982).

En concordancia con este hecho, la muerte neuronal fisiológica se produce para cada población neuronal a lo largo de un período de tiempo bien definido del desarrollo embrionario. Por ejemplo, en el ganglio ciliar del embrión de pollo se produce una pérdida de aproximadamente la mitad de las neuronas entre los días del desarrollo embrionario E8 y E14, coincidiendo con la formación de sinapsis a nivel de la musculatura del iris que, a partir de ese momento, adquiere la capacidad de ser activado mediante la estimulación del nervio ciliar (Landmesser y Pilar, 1974; Narayanan y Narayanan, 1978). Otro hecho característico de este tipo de muerte neuronal es la rapidez con la que se produce. Las neuronas afectadas por el proceso parecen evolucionar desde un estado de aparente bienestar a otro caracterizado por degeneración, muerte y fagocitosis en cuestión de tan sólo unas pocas horas.

1.2 Las funciones biológicas de la muerte neuronal fisiológica

La muerte de neuronas a lo largo del desarrollo embrionario puede servir para toda una variedad de funciones adaptativas, dependiendo en parte de la edad a la que se produce la muerte, así como de la especie, el tipo neuronal o las regiones del SN donde se localiza. Por ejemplo, la muerte neuronal puede contribuir a eliminar células defectuosas, modelar la morfología grosera de las regiones del SN o crear entornos morfológicamente permisivos para el crecimiento axonal (Glucksmann, 1951; Källen, 1965; Silver, 1978; Cuadros y Rios, 1988; Hankin et al., 1988). No obstante, la muerte neuronal fisiológica probablemente tiene dos funciones principales:

1) Ajustar numéricamente las poblaciones neuronales que se interconectan. Viktor Hamburger y Rita Levi-Montalcini (1949) ya interpretaron el fenómeno de la muerte neuronal fisiológica como un mecanismo de regulación del número de neuronas en las poblaciones neuronales definitivas. Probablemente, una estricta regulación de los números neuronales sea muy importante para determinar la adaptabilidad funcional del SN y el control del significado funcional de convergencia y divergencia de poblaciones interconectadas de neuronas (Oppenheim, 1991). Horvitz et al. (1982) ha propuesto una explicación similar para la superproducción y posterior muerte de algunas células en los nemátodos.

2) Eliminar proyecciones aberrantes o incorrectas (Clarke, 1981; Lamb et al., 1988). Existen múltiples evidencias en diversos sistemas que sugieren que la muerte neuronal fisiológica sirve para eliminar neuronas que han establecido proyecciones aberrantes (Clarke y Cowan, 1976; Lamb, 1977; Jeffrey y Perry, 1982; Laing, 1982; McLoon y Lund, 1982; O'Leary y Cowan, 1982; Insausti et al., 1985; O'Leary et al., 1986; Catsicas et al., 1987; Leventhal et al., 1988; Nakamura y O'Leary, 1989). No obstante, Oppenheim (1981b), de acuerdo con otros estudios previos (Landmesser, 1978a; Stirling y Summerbell, 1980), ha demostrado cómo la muerte fisiológica de MTN's en la médula espinal del embrión del pollo no parece actuar como un mecanismo para eliminar conexiones neuromusculares inapropiadas a lo largo del desarrollo embrionario.

Hasta no hace muchos años, se pensaba que la muerte neuronal fisiológica podía tener una cierta función morfogenética, de forma que las diferencias existentes a nivel de densidad de innervación entre diferentes territorios innervados por una misma población neuronal tras el proceso de muerte neuronal fisiológica, fueran el reflejo de un patrón regional específico de muerte programada y migración neuronal secundaria (Hamburger, 1948; Levi-Montalcini, 1950; Corliss y Robertson, 1963). No obstante, esta posible función fue descartada al demostrarse en el caso

de las MTN's espinales (Oppenheim et al., 1989b) y de las neuronas trigeminales (Davies y Lumsden, 1984), que las proporciones relativas de neuronas que inervan diferentes regiones de los respectivos territorios de inervación son las mismas antes y después del período de muerte neuronal fisiológica.

1.3 La muerte neuronal fisiológica es un fenómeno generalizado

Según la información disponible en la actualidad, parece ser que la muerte neuronal fisiológica se produce en la mayoría de los principales grupos taxonómicos y afecta a múltiples tipos de neuronas diferentes, tanto en el SNC (encéfalo y médula espinal) como en el SNP. De hecho, la muerte neuronal fisiológica ha sido documentada en una larga serie de poblaciones neuronales, entre las que se incluyen las neuronas de los ganglios sensoriales (Hamburger y Levi-Montalcini, 1949), las MTN's de la médula espinal (Hamburger, 1958, 1975; Chu-Wang y Oppenheim, 1978a, 1978b; Lance-Jones, 1982; Harris y McCaig, 1984; Oppenheim, 1986; Oppenheim et al., 1986; Forger y Breedlove, 1987), las neuronas espinales preganglionares (Levi-Montalcini, 1950; Oppenheim et al., 1982a), los ganglios del sistema nervioso autónomo (SNA) (Landmesser y Pilar, 1974; Hendry y Campbell, 1976), las neuronas de los núcleos del tronco encefálico (Cowan y Wenger, 1967, 1968; Rogers y Cowan, 1973), las células ganglionares de la retina (Rager y Rager, 1978) o neuronas que se proyectan completamente dentro del SNC (O'Leary y Cowan, 1982, 1984).

En la Tabla 1.1 se incluye un listado parcial de todos los casos conocidos de muerte neuronal fisiológica en vertebrados. No obstante, existen algunas poblaciones neuronales, como los núcleos pontinos de las aves, que no experimentan este proceso de muerte neuronal

POBLACION NEURONAL	ANIMAL
Motoneuronas	
Espinales	Pez, rana, tortuga, canguro, zarigüeya, ratón, rata, pollo, codorniz, mono, humano.
Trocleares	Salamandra, rana, pollo, codorniz, pato, humano.
Abductoras	Pato.
Oculomotoras	Pato, ratón, pollo.
Faciales	Ratón.
Trigeminales	Pollo.
Electromotoras	Raya.
Ganglios Espinales	Rana, pollo, rata.
Ganglio Pineal	Pollo.
Ganglios Ciliares	Pollo.
Ganglios Simpáticos	Pollo, rata.
Ganglios Cocleares	Pollo.
Ganglios Vestibulares	Pollo.
Ganglios Nodosos	Pollo, codorniz.
Ganglios Trigéminos	Pollo, ratón, rata.
Otocisto	Rata.
Neuronas Entéricas	Cobaya.
Línea Lateral	Rana.
Neuronas Simpáticas Preganglionares	Pollo.
Núcleo Motor Dorsal del Nervio Vago	Pollo.
Núcleo Mesencefálico del Nervio Trigémino	Pollo, hámster, rana.
Neuronas Sensoriales Rohon-Beard	Rana.
Células Precursoras Neuronales de la Médula Adrenal	Rata.
Núcleos Cocleares	Pollo, ratón.
Oliva Inferior	Pollo, rata.
Colículo Inferior	Rata.
Núcleo Istmo-óptico	Pollo, pato.
Téctum Optico	Hámster, pollo, rata, lagartija
Núcleo Ectomamilar	Pollo.
Diversos Núcleos Visuales	Musaraña.
Núcleo Parabigeminal	Rata.
Núcleo Geniculado Lateral	Ratón.
Retina	Ratón, rata, conejo, cobaya, gato, marsupial, quokka, codorniz, rata, pollo, hámster, mono, humano.
Cerebelo	Pollo, lagartija, ratón, rata.
Núcleo Habenular	Ratón.
Tálamo	Lagartija.
Hipocampo	Ratón, rata.
Cuerpo Estriado	Lagartija, rata.
Hemisferios Cerebrales	Pollo.
Córtex Olfatorio	Rata.
Córtex Cerebral	Rata, gato, ratón, hámster.

Tabla 1.1. Muerte neuronal fisiológica en los vertebrados (adaptado de: Oppenheim, 1991).

fisiológica (Armstrong y Clarke, 1979). Por otra parte, es interesante destacar que las células gliales también experimentan un proceso de

muerte fisiológica (Knapp et al., 1986; Barres et al., 1992; Ciutat et al., 1996).

1.4 La muerte neuronal fisiológica en la población de motoneuronas de la médula espinal

Viktor Hamburger y Rita Levi-Montalcini (Levi-Montalcini, 1950; Hamburger, 1958) fueron los primeros en descubrir y describir la pérdida celular masiva que de forma natural se produce en la columna motora de la médula espinal durante el desarrollo embrionario. Las MTN's postmitóticas aparecen en la médula espinal del embrión de pollo entre los días E2,5 y E5 del desarrollo embrionario (Hollyday y Hamburger, 1977), de forma que en un segmento determinado, el nacimiento de las MTN's se extiende a lo largo de 1,5 días. La población de MTN's de las columnas motoras laterales de la médula espinal lumbar del embrión de pollo alcanza un pico de ~22.000-24.000 MTN's/columna en el estadio de desarrollo 27-28 (que se corresponde con los días embrionarios o de incubación 5 y 6; E5/E6) (Hamburger, 1975; Hollyday y Hamburger, 1977; Chu-Wang y Oppenheim, 1978b).

De acuerdo con la mejor evidencia de que se dispone, las MTN's de la médula espinal lumbar del pollo empiezan a establecer conexiones sinápticas provisionales en la extremidad inferior entre E5 y E6 (Landmesser y Morris, 1975; Bekoff, 1976; Hollyday y Hamburger, 1977; Oppenheim y Chu-Wang, 1977; Landmesser, 1978a; Tosney y Landmesser, 1985). Si bien se pueden observar algunas imágenes de MTN's en proceso de degeneración tan pronto como el día E4 (Chu-Wang y Oppenheim, 1978a), la pérdida celular masiva que se corresponde con el proceso de muerte neuronal fisiológica sólo se hace evidente a partir del día E5,5. Dicho proceso se prolonga hasta el día E12, aunque en los dos últimos días la pérdida celular es mucho más discreta (Chu-Wang y Oppenheim, 1978a). Mientras que las MTN's que

mueren inicialmente son bastante inmaduras, la mayoría de las que mueren a partir del estadio 26 están ya completamente diferenciadas (Chu-Wang y Oppenheim, 1978a).

Se estima que durante este proceso de muerte se produce una degeneración del ~40-60% de las MTN's (Hamburger, 1975; Chu-Wang y Oppenheim, 1978b; Oppenheim y Majors-Willard, 1978), lo que equivale a unas 11.000-12.500 MTN's en cada columna motora lateral de la médula espinal lumbar (Figura 1.1). Hamburger (1975) ha estimado que por lo menos el 5-6% de la población total se encuentra sumido en el proceso de degeneración en un momento dado. Por otra parte, parece claro que el número de axones que se degeneran a nivel de la raíz ventral de los nervios espinales es comparable al número de MTN's de la columna motora lateral que degeneran durante el período de muerte fisiológica (Chu-Wang y Oppenheim, 1978b).

Curiosamente, la muerte fisiológica de MTN's en la médula espinal a nivel braquial en los embriones de pollo se inicia algo más tarde -hacia E8- y se prolonga durante más tiempo que en la región lumbar (Hamburger, 1975; Oppenheim y Majors-Willard, 1978; Laing, 1982). Entre los días E8 y E21, coincidiendo con la eclosión del pollo, se produce la pérdida de ~11.000 MTN's braquiales, que suponen cerca del 60% de la población original (Oppenheim y Majors-Willard, 1978).

Esta aparente descoordinación temporal en el proceso de muerte neuronal fisiológica entre las MTN's de la médula espinal braquial y lumbar del pollo, probablemente se debe a que el conjunto de las MTN's del asta anterior de la médula espinal no constituyen una población sincronizada a lo largo del desarrollo embrionario. De hecho, dicha asincronía parece existir incluso dentro de un mismo segmento medular. Por ejemplo, en la columna motora lumbar, aquellas MTN's destinadas a

inervar la masa muscular ventral nacen antes que la población que se proyecta dorsalmente (Hollyday y Hamburger, 1977; Landmesser, 1978b).

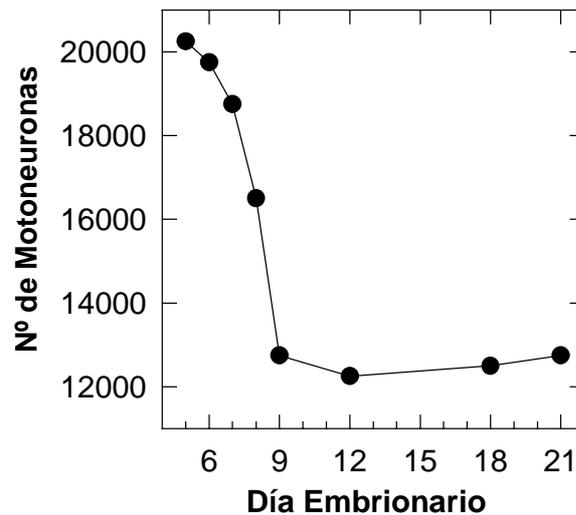


Figura 1.1. Muerte de las MTN's de la médula espinal lumbar durante el desarrollo embrionario del pollo (adaptado de: Hamburger, 1975).

Lance-Jones (1982) también ha cuantificado el proceso de muerte fisiológica de MTN's en la médula espinal lumbar del embrión de ratón, anteriormente descrito por Flanagan (1969). Entre los días E13 y E18 del desarrollo embrionario, se muere un 67% de las MTN's presentes inicialmente en la columna motora, lo que equivale a ~3.350 células de un total de 5.000 (Lance-Jones, 1982). El pico de muerte se produce el día E14 (Flanagan, 1969; Lance-Jones, 1982), de tal manera que el 85% de las muertes acontecen entre los días E13 y E15 (Lance-Jones, 1982). Es interesante destacar que, mediante técnicas de marcaje retrógrado de las MTN's con peroxidasa de rábano, Lance-Jones (1982) demostró que la mayoría de las MTN's que mueren de forma fisiológica han emitido prolongaciones axonales a sus dianas previamente.

1.5 La morfología de la muerte neuronal fisiológica

Se han realizado diversas descripciones a nivel morfológico del proceso de degeneración de las neuronas durante el desarrollo embrionario de los vertebrados (O'Connor y Wyttenback, 1974; Panesse, 1976; Pilar y Landmesser, 1976; Chu-Wang y Oppenheim, 1978a; Sohal y Weidman, 1978). Los estudios de microscopía óptica muestran cómo las neuronas que degeneran durante el proceso de muerte neuronal fisiológica experimentan una condensación de su citoplasma (Chu-Wang y Oppenheim, 1978a). Sin embargo, parece claro que a nivel ultraestructural se pueden diferenciar dos tipos distintos de degeneración neuronal (Pilar y Landmesser, 1976; Chu-Wang y Oppenheim, 1978a).

En el primer tipo, denominado *nuclear*, los cambios más precoces y dramáticos se observan en el núcleo, donde la cromatina se condensa de forma atípica. El citoplasma tiene un aspecto inmaduro, con muy poco retículo endoplasmático rugoso y numerosos monorribosomas libres, mientras que la mayoría de las mitocondrias experimentan un proceso de vacuolización. En etapas más tardías de degeneración, la cromatina sigue condensándose y la envoltura nuclear se fragmenta.

En el segundo tipo de muerte neuronal, denominada *citoplasmática*, los cambios iniciales no se localizan en el núcleo sino en el citoplasma. Se observan abundantes cisternas intracitoplasmáticas considerablemente dilatadas, correspondientes en parte a retículo endoplasmático rugoso, envoltura nuclear y aparato de Golgi. Los ribosomas continúan agregados formando polirribosomas, mientras que sólo unas pocas mitocondrias presentan signos de degeneración. La célula nerviosa muestra una densidad electrónica uniforme y está aparentemente encogida. La cromatina nuclear se acabará condensando

también y se intensificará la degradación citoplasmática. A medida que va progresando este tipo de degeneración, se produce la disgregación de los sistemas membranosos en numerosas vesículas, algunas de las cuáles mantienen ribosomas adheridos. Sólo al final de todo el proceso se origina la disociación de los polirribosomas en monorribosomas. A continuación, la membrana nuclear desaparece y se mezcla el contenido nuclear con el citoplasmático. En última instancia, la célula ya muerta se fragmenta en varios glóbulos cuya membrana permanece íntegra, que seguidamente son fagotizados por los leucocitos mononucleares, las células endoteliales radiales y, posiblemente también, las células de la microglía en la proximidad (Chu-Wang y Oppenheim, 1978a).

Pilar y Landmesser (1976) sugirieron que el grado de madurez de las neuronas probablemente condiciona el patrón morfológico de muerte que presentan. Aquellas neuronas con un mayor grado de maduración tendrían un patrón morfológico de muerte de tipo *citoplasmático* mientras que a las más inmaduras les correspondería el *nuclear*. El grado de maduración de una neurona determinada, en el momento de iniciarse el proceso de muerte neuronal fisiológica, está probablemente condicionado por los contactos establecidos con sus dianas de inervación y/o sus aferencias.

En el caso concreto de las MTN's de la médula espinal, Chu-Wang y Oppenheim (1978a), a nivel lumbar, y O'Connor y Wytttenbach (1974), a nivel cervical, han descrito a nivel ultraestructural observaciones similares a las de Pilar y Landmesser (1976) en las neuronas del ganglio ciliar. Es interesante destacar que los axones en proceso de degeneración, durante el período de muerte fisiológica de las MTN's de la médula espinal, se caracterizan a nivel estructural por la presencia de numerosas estructuras vesiculadas, vacuolas autofágicas limitadas por membrana, imágenes lamelares membranosas y cuerpos electrodensos en porciones dilatadas del axón, así como por la disrupción del axolema (Chu-Wang y

Oppenheim, 1978b). Este proceso de degeneración parece deberse a la autólisis progresiva, siendo fagocitados los residuos resultantes por las células de Schwann y algunos leucocitos mononucleares en la proximidad (Chu-Wang y Oppenheim, 1978b).

1.6 La muerte neuronal fisiológica no está programada genéticamente

En general se acepta que la muerte neuronal fisiológica en los vertebrados no está programada genéticamente (Hamburger y Oppenheim, 1982; Cowan et al., 1984). Aunque aún no existen evidencias inequívocas de este hecho, se han realizado múltiples estudios en diferentes poblaciones neuronales en los que se ha demostrado que el número final de neuronas que mueren durante el período de muerte neuronal fisiológica puede ser aumentado o disminuido experimentalmente a través de la alteración de las interacciones intercelulares (Oppenheim, 1981a). Por otro lado, se ha demostrado que las neuronas embrionarias no se mueren en base a su genealogía (Leber et al., 1990), algo que sería de esperar si la decisión de morir estuviese genéticamente predeterminada. Por contra, la decisión de morir parece establecerse a nivel de cada célula.

El hecho de que la muerte neuronal fisiológica no parezca estar programada genéticamente, no implica necesariamente que se trate de un proceso de naturaleza aleatoria. En función de la propia naturaleza de la muerte neuronal fisiológica, algunas células probablemente cuentan con ventajas en la competición por la supervivencia a lo largo del período de muerte celular. Dicha ventaja podría depender, entre otros, de una aparición más precoz de las neuronas, un crecimiento más rápido, una ramificación axonal incrementada, el establecimiento más precoz o más extenso de contactos aferentes o con las células diana, menores necesidades metabólicas de un factor trófico suministrado por las células

dianas o aferentes, un mayor número de receptores de membrana para moléculas tróficas extracelulares o, por último, diferencias funcionales de los elementos pre y postsinápticos. Todos estos aspectos podrían estar bajo un control genético a su vez susceptible de ser regulado por diferentes factores que, por consiguiente, pueden influir sobre la supervivencia celular.

1.7 Muerte neuronal fisiológica: un proceso dependiente del tejido periférico

A lo largo del primer cuarto de este siglo, se realizaron toda una serie de estudios que ya sugerían que el número final de neuronas en los diversos centros nerviosos de los animales vertebrados está determinado por la presencia y el tamaño relativo de la diana de inervación neuronal. En 1909, M.L. Shorey describió que la eliminación de los esbozos de extremidad en embriones de pollo y en larvas anfibias producía una deplección de las MTN's de la extremidad y de las neuronas de los ganglios sensoriales correspondientes.

Esta relación fue confirmada por S. Detwiler (1920, 1936), quien halló que la implantación de una extremidad adicional en embriones anfibios muy precoces inducía un incremento en la población neuronal de los ganglios sensoriales correspondientes. Finalmente, V. Hamburger, en 1934, demostró la existencia de una relación de proporcionalidad entre la cantidad de tejido diana eliminada y el número de neuronas de la población inervadora. Uno de los experimentos ya clásicos consistió en extirpar el esbozo de una extremidad antes de su inervación, logrando así potenciar la muerte celular fisiológica de MTN's en la médula espinal del embrión de pollo (Hamburger y Levi-Montalcini, 1949; Hamburger, 1958).

Posteriormente, se comprobó cómo en la mayoría de las poblaciones neuronales que experimentan el proceso de muerte neuronal

fisiológica, el calendario y las dimensiones de la pérdida celular está controlada, por lo menos parcialmente, por influencias derivadas de o asociadas con las dianas sinápticas de las neuronas. Los primeros investigadores que ampliaron la demostración experimental de V. Hamburger, fueron Cowan y Wenger (1967) en el núcleo troclear, y Prestige (1967) en las MTN's de la rana. Estos autores observaron que la eliminación del tejido diana de inervación producía la pérdida de la práctica totalidad de las neuronas en el mismo período de tiempo que la muerte neuronal fisiológica.

De la misma forma, Landmesser y Pilar (1974) observaron cómo la eliminación del tejido de inervación correspondiente al ganglio ciliar comporta que un mayor número de neuronas ganglionares degeneren y mueran durante el período de muerte fisiológica. Posteriormente se demostró que al practicar una delección parcial o completa de los tejidos diana, de hecho se producía una exacerbación del proceso de muerte neuronal fisiológica, no siendo posible la detección de ninguna diferencia relevante a nivel morfológico entre la citada muerte neuronal fisiológica y la degeneración de neuronas magnificada por la eliminación de tejidos diana (Chu-Wang y Oppenheim, 1978a; Oppenheim, 1981a, 1985; Hamburger y Oppenheim, 1982).

Por otra parte, cuando se utilizan estrategias experimentales para aumentar la disponibilidad de tejido diana para las neuronas, se consigue reducir de forma significativa la magnitud del proceso de muerte neuronal fisiológica y, por consiguiente, un aumento en el número de neuronas supervivientes al finalizar dicho proceso (Oppenheim, 1981a, 1985; Lamb, 1984; Betz, 1987). Por ejemplo, en el pollo la adición de un miembro aumenta el número de MTN's que sobreviven al conseguir para las mismas una reducción de la muerte fisiológica del orden del 15-27% (Hollyday y Hamburger, 1976). Asimismo, al incrementar el tejido que inervan las neuronas del ganglio ciliar mediante el trasplante de un ojo

adicional en el pollo, se observa una supervivencia mayor de neuronas en los núcleos oculomotores accesorios (Narayanan y Narayanan, 1978), trocleares e istmo-ópticos (Boydston y Sohal, 1979).

A la vista de todas estas observaciones resulta lógico concluir que, durante el período de muerte neuronal fisiológica, la supervivencia de las neuronas embrionarias está condicionada en gran medida por el aporte de un trofismo asociado al tejido periférico que inervan. Al iniciarse el proceso de muerte neuronal fisiológica, aquellas neuronas en exceso que no consiguen cantidades suficientes inician un proceso de degeneración que les lleva a la muerte. No obstante, aunque en la mayoría de los casos descritos de muerte neuronal fisiológica las dianas están fuertemente implicadas en la regulación de la supervivencia neuronal, parece evidente que existen otras influencias derivadas de las aferencias, células gliales y matriz extracelular que también son decisivas en la regulación de la muerte neuronal. Asimismo, existe una serie de estudios que demuestran que la muerte neuronal fisiológica en algunas poblaciones celulares se produce en gran medida o casi completamente de forma independiente de las influencias tróficas de las dianas (Beazley et al., 1987; Farel, 1987, 1989; Horsburgh y Sefton, 1987; Pallas et al., 1988; Windrem et al., 1988).

La aparente dependencia trófica del tejido diana de inervación que presentan las neuronas durante el período de muerte neuronal fisiológica ya llamó la atención de Prestige en 1967, quien en base a sus observaciones propuso que, durante el desarrollo embrionario las neuronas pasan por tres etapas diferentes en relación con sus requerimientos tróficos:

- 1) Una primera, previa al período de muerte neuronal fisiológica, en la que las neuronas pueden sobrevivir sin estar en contacto con el tejido periférico que inervan. Por ejemplo, la producción inicial de MTN's y su

migración a la columna motora lateral de la médula afectada no se ven influenciadas por la falta del esbozo de la extremidad en un embrión de pollo, ya sea mediante ablación (Hamburger, 1958; Prestige, 1967; Oppenheim et al., 1978; Lamb, 1981) o mutación genética (Lanser y Fallon, 1984), no iniciándose la muerte masiva de MTN's hasta E5 (Hamburger, 1958; Oppenheim et al., 1978). Por otra parte, se ha demostrado que todas las MTN's del asta anterior de la médula espinal, incluyendo aquéllas que morirán, proyectan sus axones hacia la musculatura de las extremidades y establecen contactos sinápticos con el tejido muscular antes de iniciarse el proceso de muerte neuronal fisiológica (Hamburger, 1958; Prestige y Wilson, 1972; Landmesser y Morris, 1975; Oppenheim y Heaton, 1975; Atsumi, 1977; Oppenheim y Chu-Wang, 1977; Chu-Wang y Oppenheim, 1978a, 1978b; Oppenheim et al., 1978). También se han obtenido datos similares para la poblaciones de neuronas del núcleo istmo-óptico (Clarke y Cowan, 1976) y del ganglio ciliar (Pilar y Landmesser, 1976) del pollo.

Más recientemente, Méttlíng et al. (1995) han demostrado que las MTN's espinales del embrión de pollo no adquieren dependencia trófica respecto del músculo esquelético que inervan hasta 1-2 días después de su nacimiento. Asimismo, Vogel y Davies (1991) han descrito cómo las neuronas sensoriales de los ganglios nodoso, petroso y geniculado, aisladas en estadios postmitóticos precoces, son capaces de sobrevivir durante varios días en ausencia de soporte trófico. Interesantemente, parece existir una correlación entre el tiempo que tardan las neuronas sensoriales en adquirir su dependencia trófica *in vitro* y el tiempo que tardan en alcanzar sus dianas de inervación *in vivo* (Vogel y Davies, 1991). Este período de independencia trófica parece corresponderse con el tiempo necesario para que las neuronas embrionarias establezcan la inervación de sus dianas (Vogel y Davies, 1991; Méttlíng et al., 1995).

2) Una segunda, que corresponde al período de muerte neuronal fisiológica, en la que el contacto con el tejido periférico es indispensable

para la supervivencia de las neuronas, en función del aporte trófico que éste les proporciona. De hecho, la muerte neuronal fisiológica no refleja el fracaso de las neuronas para conseguir que sus axones lleguen hasta la periferia, sino su incapacidad para alcanzar cantidades suficientes del aporte trófico suministrado por el tejido diana de inervación.

3) Una tercera y última, tras el período de muerte neuronal fisiológica, en la que las neuronas maduran y reducen progresivamente su dependencia de las interacciones con el tejido diana (Prestige, 1970; Lieberman, 1974; Houthoff y Drukker, 1977; Dohrman et al., 1986; Oppenheim et al., 1988).

Es interesante destacar que, aunque algunas poblaciones neuronales pierden completamente su dependencia de los tejidos diana de inervación con la maduración (Catsicas y Clarke, 1987; Sofroniew et al., 1990), tanto en el período postnatal como en el animal adulto, un gran número de poblaciones neuronales siguen dependiendo, aunque en menor grado, del tejido diana que inervan tanto para su supervivencia como para el mantenimiento de su estado de diferenciación, morfología normal o mecanismos biosintéticos (revisado por: Kuno, 1990; Oppenheim, 1991). En estadios adultos o postnatales se produce una notable pérdida de neuronas, tanto en el SNP como en el SNC, al privarlas de sus dianas de inervación. Dicha pérdida es típicamente menor o más lenta.

Tal es el caso en los ganglios trigéminos de ratas adultas (Aldskogius y Arvidsson, 1978), los ganglios espinales de ratas neonatales, postnatales y adultas (Gorin y Johnson, 1980a; Johnson et al., 1982; Heath et al., 1986; Miyata et al., 1986; Otto et al., 1987; Rich et al., 1987; Schmalbruch, 1987; Himes y Tessler, 1989), los ganglios simpáticos de ratas postnatales y adultas (Hendry, 1975b; Purves, 1975; Hendry y Campbell, 1976; Gorin y Johnson, 1980a; Johnson et al., 1982),

células de los ganglios retinales de ranas y ratas neonatales y adultas (Humphrey et al., 1987; Villegas-Pérez et al., 1988; García-Valenzuela et al., 1994; Rabacchi et al., 1994), neuronas colinérgicas de los núcleos de la base encefálica (Hefti, 1986), MTN's hipoglosas de ratas postnatales y adultas (Snider y Thanedar, 1989), el núcleo motor dorsal del nervio vago en cobayas adultas (Laiwand et al., 1987), neuronas corticoespinales (Barron et al., 1988) y rubroespinales (Bregman y Reier, 1986) de ratas postnatales, neuronas de la columna de Clarke de ratas adultas (Feringa et al., 1987), y el ganglio submandibular de la rana adulta (Womble y Roper, 1987).

Asimismo, las MTN's espinales siguen dependiendo para su supervivencia del tejido muscular que inervan durante el período postnatal y en el animal adulto. Al practicar una axotomía, se observa una pérdida significativa de MTN's neonatales y adultas (Kawamura y Dyck, 1981; Sarnat, 1984; Schmalbruch, 1984; Kashihara et al., 1987; Snider y Thanedar, 1989; Crews y Wigston, 1990; Sendtner et al., 1990; Pollin et al., 1991; Snider et al., 1992; Lowrie et al., 1995), aunque es más lenta y de menor intensidad que la que se produce durante el desarrollo embrionario. Este hecho podría sugerir que, en el período postnatal, la supervivencia de las MTN's espinales ya no está regulada del mismo modo que durante el desarrollo embrionario.

1.8 Influencias de las aferencias y de otras células no diana en la supervivencia neuronal

Tradicionalmente, la importancia de las aferencias en la supervivencia de una determinada neurona ha sido infravalorada. Aunque se conoce desde hace mucho tiempo que el desarrollo y el mantenimiento de las dendritas, del tamaño celular y de algunos aspectos funcionales de las neuronas están regulados por las aferencias (Cowan, 1970; Globus, 1975; Jacobson, 1978; Deicht y Rubel, 1984; Purves, 1988), se ha

estudiado muy poco la posibilidad de que las aferencias también influyan sobre la supervivencia neuronal. No obstante, existen diversos estudios que evidencian la influencia de las aferencias sobre el mantenimiento de la supervivencia neuronal en períodos posteriores a la muerte neuronal fisiológica (Davis y Constantine-Paton, 1983; Born y Rubel, 1985; Stewart y Rubel, 1985; Triarhou et al., 1987; Hashisaki y Rubel, 1989) y en el adulto (Eidelberg et al., 1989). Asimismo, las aferencias también regulan de forma determinante el proceso de muerte neuronal fisiológica, sugiriendo que en algunos casos su importancia es comparable a la de la influencia ejercida por los tejidos diana de inervación.

La reducción de las aferencias neuronales, previamente o durante el período de muerte neuronal fisiológica, conlleva un aumento significativo de la muerte neuronal en los núcleos cocleares (Levi-Montalcini, 1949; Parks, 1979; Trune, 1982), el núcleo istmo-óptico (Clarke, 1985; Sohal et al., 1986), el ganglio ciliar (Furber et al., 1987), el núcleo geniculado lateral (Finlay et al., 1986), el núcleo ectomamilar (Kwei y Fite, 1985), el colículo superior y el núcleo geniculado lateral (Crewther et al., 1988), el córtex olfatorio (Friedman y Price, 1986), el núcleo parabigeminal (Linden y Pinon, 1987), la retina (Linden y Perry, 1982), el ganglio cervical superior (Wright, 1987), las células de Mauthner (Piatt, 1947, 1969), y en el núcleo vestibular (Peusner y Morest, 1977).

La supervivencia de las MTN's también depende de sus aferencias (Okado y Oppenheim, 1984; Furber et al., 1987). Cuando se eliminan varios segmentos del tubo neural torácico en fases muy precoces del desarrollo embrionario del pollo, se consigue incrementar el proceso de muerte fisiológica de las MTN's espinales (Okado y Oppenheim, 1984). Una pérdida similar de MTN's lumbares ha sido descrita en ratas adultas tras practicar una sección de la médula espinal torácica (Eidelberg et al., 1989). Por otro lado, se ha descrito que el aumento de las aferencias

mediante manipulación experimental consigue reducir la magnitud de la muerte neuronal fisiológica (Cunningham et al., 1979).

Aunque se desconoce cómo se integran las interacciones de los tejidos diana y de las aferencias para regular el número de neuronas supervivientes (Okada et al., 1989), debe existir algún mecanismo por el que se establece un equilibrio entre las dos influencias durante el desarrollo normal (Cunningham, 1982). Es probable que en algunos casos las aferencias y las dianas de inervación sean igualmente importantes, mientras que en otros casos el equilibrio podría estar desplazado hacia uno de ellos. Por último, no hay que olvidar que un conjunto cada vez mayor de evidencias sugieren que moléculas derivadas de la glía y de la matriz extracelular, así como otras interacciones entre neuronas y células no neuronales, también juegan un papel importante en la regulación de la supervivencia de neuronas durante el desarrollo del SN (Hamburger et al., 1981; Johnson et al., 1988b; Barde, 1989; Hama et al., 1989; Walicke, 1989). De hecho, es ya clásica la observación de que el medio condicionado de cultivos de astrocitos puede estimular la supervivencia neuronal y el crecimiento neurítico (Lauder y McCarthy, 1986; Manthorpe et al., 1986b; Lindholm et al., 1987).

1.9 La supervivencia neuronal está regulada por la actividad neuronal

La observación de que en muchas poblaciones neuronales la sinaptogénesis a nivel de los tejidos dianas (y en algunos casos el establecimiento de contactos con las aferencias) coincide con el período de muerte neuronal fisiológica, llevó a diversos investigadores a hipotetizar que la actividad neuronal *per se* está implicada en la regulación de dicho fenómeno de muerte. Aparentemente, el solo hecho del establecimiento de contactos sinápticos funcionales con sus células diana no protege a una neurona de la muerte (Landmesser y Pilar, 1974),

pudiéndose encontrar sinapsis degenerativas en los tejidos dianas durante el período de muerte neuronal fisiológica (Landmesser y Pilar, 1978).

Son muchos los estudios que sugieren que la actividad eléctrica a nivel de los contactos sinápticos de las neuronas con sus aferencias y células diana, es relevante en la regulación de la muerte neuronal fisiológica. Al suprimir crónicamente la transmisión sináptica mediante el empleo de agentes farmacológicos, se consigue reducir e incluso prevenir totalmente la desaparición de neuronas (Laing y Prestige, 1978; Pittman y Oppenheim, 1978, 1979; Creazzo y Sohal, 1979; Olek, 1980; Oppenheim, 1981b; Zilles et al., 1981; Oppenheim et al., 1982b; Ding et al., 1983; Harris y McCaig, 1984; Raabe y Finlay, 1984; Arens y Straznicky, 1986; Breneman y Eiden, 1986; Lipton, 1986; Meriney et al., 1987; Oppenheim, 1987).

La relación existente entre la actividad neuromuscular y el proceso de muerte programada de las MTN's espinales constituye un bonito ejemplo de cómo la actividad neuronal puede contribuir a la regulación de la muerte neuronal fisiológica durante el desarrollo embrionario. Al suprimir crónicamente la actividad neuromuscular durante el período de muerte neuronal fisiológica de las MTN's espinales con agentes farmacológicos y neurotoxinas, se consigue reducir e incluso evitar totalmente su desaparición (Laing y Prestige, 1978; Oppenheim y Majors-Willard, 1978; Pittman y Oppenheim, 1978, 1979; Creazzo y Sohal, 1979; Olek, 1980; Doi, 1981; Oppenheim, 1984, 1987). Dichos tratamientos no permiten aumentar el número de MTN's vivas si se inician una vez ya superado el período de muerte fisiológica, ni tampoco bloquean la muerte de MTN's producida por la amputación de extremidades, demostrando que su efecto no es el resultado de una posible acción a nivel central sobre la actividad sináptica de las MTN's (Pittman y Oppenheim, 1979).

Al cesar la administración de bloqueantes neuromusculares y conseguir el restablecimiento de la actividad neuromuscular, las MTN's inicialmente rescatadas de la muerte fisiológica experimentan una muerte celular retrasada en el tiempo (Pittman y Oppenheim, 1978, 1979; Oppenheim, 1984, 1987). Aparentemente, la parálisis neuromuscular no afecta el proceso de diferenciación de las MTN's espinales (Pittman y Oppenheim, 1979; Oppenheim, 1981b, 1984; Oppenheim y Chu-Wang, 1983; Oppenheim et al., 1989a). Aquellas MTN's rescatadas mediante el bloqueo neuromuscular sobreviven una vez se ha producido la eclosión del pollo, siendo capaces de integrarse en el SN del animal postnatal (Oppenheim, 1984).

Curiosamente, en ratones portadores de la mutación genética *mdg* (disgenesia muscular), que reduce o elimina la actividad neuromuscular embrionaria y fetal en relación con la existencia de un defecto primario en el acoplamiento entre la excitación y la contracción a nivel muscular, también se ha observado un incremento significativo de la supervivencia de MTN's espinales (Oppenheim et al., 1986). Contrariamente a lo que ocurre cuando se reduce, el aumento de la actividad neuromuscular mediante la administración de fármacos (Boydston y Sohal, 1980; Oppenheim y Maderdrut, 1981) o la estimulación eléctrica crónica de las extremidades *in vivo* (Oppenheim y Núñez, 1982) durante el período de muerte neuronal fisiológica, permite acelerar o potenciar la pérdida de MTN's espinales. Esta observación constituye un dato más en favor de la participación de la actividad neuromuscular en la regulación de la muerte fisiológica de las MTN's de la médula espinal durante el desarrollo embrionario.

En algunas situaciones, el efecto de las aferencias sobre la supervivencia neuronal también parece estar mediado por la actividad neuronal (Catsicas et al., 1992). Existen múltiples ejemplos de este hecho. La desaferenciación quirúrgica del ganglio ciliar durante el

desarrollo embrionario produce una potenciación de la pérdida de neuronas durante el período normal de muerte neuronal (Furber et al., 1987). Este período coincide con el establecimiento de contactos funcionales entre los terminales presinápticos y las neuronas del ganglio ciliar (Landmesser y Pilar, 1978). El tratamiento de los embriones con agentes bloqueantes ganglionares, consiguiendo una reducción de la transmisión sináptica entre las células pre y postsinápticas, incrementa significativamente la pérdida celular en el ganglio ciliar (Wright, 1981; Maderdrut et al., 1988) y en los ganglios simpáticos del embrión de pollo (Maderdrut et al., 1988).

También se ha implicado la actividad presináptica de las aferencias en la muerte fisiológica de células del ganglio de la retina *in vitro* (Lipton, 1986) y en cultivos de médulas espinales tratados con tetrodotoxina (Brenneman et al., 1985; Brenneman y Eiden, 1986). El bloqueo de la actividad aferente en el octavo par craneal de pollos postnatales con tetrodotoxina, causa rápidamente unos cambios morfológicos y metabólicos iniciales en neuronas de los núcleos cocleares, seguido de una muerte neuronal substancial (Born y Rubel, 1985, 1988; Stewart y Rubel, 1985; Deitch y Rubel, 1989a, 1989b; Pasic y Rubel, 1989).

El mecanismo por el que la actividad neuronal afecta el mantenimiento y la supervivencia de neuronas, es desconocido. El papel crítico de las sinapsis en la mediación de la muerte neuronal fisiológica, probablemente está relacionado con mecanismos tan convencionales como la liberación de neurotransmisores, la transmisión sináptica o la actividad postsináptica, o con la hipótesis más atractiva de que funcionen como sitios de liberación o captación de moléculas neurotróficas de supervivencia. Más concretamente, se ha hipotetizado que, una vez que las neuronas ya han establecido contacto con sus dianas de inervación, la actividad sináptica podría estar regulando una serie de mecanismos que condicionan una reducción de la disponibilidad de una o varias

substancias tróficas necesarias para la supervivencia neuronal (Hsu et al., 1982; Oppenheim et al., 1988; Oppenheim, 1989).

Una posibilidad muy atractiva es que la actividad sináptica participe en la regulación de la formación de contactos sinápticos. El caso concreto de las MTN's espinales resulta de nuevo muy clarificador. Estas neuronas establecen contactos sinápticos con las fibras musculares (sus células diana) a nivel de unas estructuras muy bien definidas conocidas como placas motoras. Durante el desarrollo embrionario de los animales vertebrados, las placas motoras cuentan con inervación polineuronal, a diferencia de lo que ocurre en la edad adulta en que están inervadas por un solo axón (Redfern, 1970; Bagust et al., 1973; Bennett y Pettigrew, 1974; Benoit y Changeux, 1975; Brown et al., 1976; Riley, 1976). Interesantemente, desde hace tiempo se conocía la implicación de la actividad neuromuscular en la reducción de la inervación polineuronal del músculo durante el desarrollo embrionario de los invertebrados (Benoit y Changeux, 1978). Posteriormente, se comprobó como durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, al provocar farmacológicamente la parálisis neuromuscular, se observa en prácticamente todos los músculos un mayor grado de ramificación nerviosa intramuscular (Holland y Brown, 1980; Dahm y Landmesser, 1988) y de formación de sinapsis a nivel del músculo diana (Ding et al., 1983; Oppenheim, 1984; Thompson, 1985; Oppenheim et al., 1986, 1989a; Dahm y Landmesser, 1988), existiendo un claro aumento en el número de uniones neuromusculares por fibra muscular (Jansen et al., 1973; Jansen y van Essen, 1975; Pittman y Oppenheim, 1979; Cangiano et al., 1980; Oppenheim, 1984).

Este hecho aparentemente no se debe a que las MTN's espinales rescatadas de la muerte fisiológica también proyecten sus axones hacia el tejido muscular (Oppenheim, 1981b), sino que indica que la actividad neuromuscular participa activamente en la limitación del número de

lugares sinápticos que se pueden formar sobre una fibra muscular, ya que, al bloquear la transmisión sináptica a nivel de las placas motoras, hay una mayor capacidad de las fibras musculares para establecer sinapsis adicionales, por ejemplo, a través de una hipotética regulación de los niveles de receptores de acetilcolina en el músculo o de determinadas moléculas de adhesión celular, claves para la sinaptogénesis (Pittman y Oppenheim, 1979; Oppenheim, 1981a; Dahm y Landmesser, 1988; Landmesser et al., 1988, 1990).

Se ha sugerido que, al limitar el número de lugares sinápticos que se pueden formar sobre una célula muscular, la actividad neuromuscular regula la accesibilidad a ciertas sustancias tróficas, propiciando así una competición por la supervivencia entre las diferentes MTN's (Oppenheim, 1989). En apoyo de esta hipótesis, se ha observado que la disminución crónica de la actividad neuromuscular no supone un incremento en la cantidad de factor trófico producido por los músculos diana de inervación (Tanaka, 1987; Houneou et al., 1991).

Otra posibilidad es que la transmisión sináptica regule negativamente la síntesis de factores neurotróficos producidos por las dianas de inervación. Así, el bloqueo farmacológico de la transmisión sináptica permitiría una mayor disponibilidad de factor trófico, favoreciendo un incremento de la supervivencia neuronal. Existen estudios que demuestran que la denervación incrementa el nivel de actividad neurotrófica producida por el músculo (Ebendal et al., 1980; Slack y Pockett, 1982; Henderson et al., 1983; Nurcombe et al., 1984; Hill y Bennett, 1986; Charnet-Gouin et al., 1991; Houenou et al., 1991; Rassendren et al., 1992).

2. LOS FACTORES NEURÓTRÓFICOS

La historia de los agentes tróficos podría retroceder en el tiempo tan atrás como principios de siglo, cuando Santiago Ramón y Cajal postuló las interacciones tróficas como mecanismos importantes en el desarrollo neural (Ramón y Cajal, 1929). Durante los últimos 40 años, los investigadores del desarrollo neuronal han formulado un marco conceptual conocido como *Teoría Neurotrófica*, que permite explicar un gran número de hallazgos en relación con las interacciones entre las neuronas y sus dianas de inervación (Hamburger y Oppenheim, 1982; Purves, 1986, 1988).

Dicha Teoría surgió de los estudios pioneros sobre la muerte celular embrionaria de Viktor Hamburger y Rita Levi-Montalcini en los años 40 y 50 (Oppenheim, 1981a), quienes fueron responsables del descubrimiento del factor de crecimiento nervioso (NGF) (Levi-Montalcini y Hamburger, 1951; Purves y Sanes, 1986; Levi-Montalcini, 1987a, 1987b). Posteriormente, se han identificado otras moléculas neurotróficas, que han sido catalogadas junto con el NGF en una misma familia, las neurotrofinas (NT's). Adicionalmente, en los últimos años se ha comprobado cómo una larga serie de moléculas biológicas presentan acciones neurotróficas aunque no pueden ser consideradas NT's en sentido estricto. Tal es el caso del factor neurotrófico ciliar (CNTF), que en la actualidad es considerado un factor de regeneración, o de una serie de mitógenos, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF's), etc. Globalmente, nuestro conocimiento sobre la relevancia de todos estos agentes con actividad neurotrófica, sean considerados NT's o no, es aún limitado.

En la infinidad de intentos para aislar nuevas moléculas neurotróficas a partir de tejidos diana de inervación u otros tejidos, se han empleado como sistemas de bioensayo cultivos de explantes neuronales y neuronas disociadas y/o purificadas. A la hora de interpretar los múltiples estudios existentes, hemos de ser especialmente cautos dado que una gran diversidad de moléculas son capaces de ejercer efectos inespecíficos sobre el crecimiento neurítico y la supervivencia *in vitro*. Cuando se cultivan neuronas en medios de cultivo definidos sin suero, las células carecen de muchas sustancias precisas para su crecimiento normal. Bajo estas condiciones, las posibilidades de que moléculas inespecíficas tengan efectos “tróficos” aumentan significativamente. El piruvato, la catalasa, el α -cetoglutarato o los gangliósidos son claros ejemplos de sustancias que estimulan de forma aparentemente inespecífica la supervivencia de cultivos neuronales (Facci et al., 1985; Selak et al., 1985; Walicke et al., 1986a; Leon et al., 1988; Cannella et al., 1990; Juurlink et al., 1991b).

2.1 La Teoría Neurotrófica

La *Teoría Neurotrófica* proporciona un marco útil para comprender la muerte masiva de neuronas que ocurre en múltiples regiones del SN durante el desarrollo embrionario. Tras generarse un número excesivo de células neuronales, se produce la eliminación de aquellas superfluas o conectadas incorrectamente poco después de que hayan inervado sus respectivos tejidos diana (revisado en Capítulo 1). La Teoría Neurotrófica establece que el fenómeno de muerte neuronal programada está gobernado por la competición de las diferentes neuronas y sus procesos por agentes neurotróficos, que a su vez son suministrados por los tejidos diana de inervación en cantidades limitadas y limitantes, y son imprescindibles y específicos para la supervivencia y diferenciación de las

neuronas que inervan dichos tejidos (Hamburger y Oppenheim, 1982; Barde, 1988, 1989; Davies, 1988; Oppenheim, 1989).

Aunque se han identificado varios factores neurotróficos que aparentemente tienen una función similar a la del NGF en otras poblaciones neuronales, el NGF sigue siendo la molécula neurotrófica mejor caracterizada. De hecho, el NGF es considerado como el prototipo de una familia de factores neurotróficos conocidos como NT's.

Para que una molécula sea considerada como una NT, debe reunir una serie de criterios. Las NT's han de estar disponibles en cantidades subsaturantes o limitantes; actúan sobre las neuronas presinápticas mediante su interacción con receptores, y; son captadas a nivel de los terminales nerviosos, siendo transportadas retrógradamente hasta el soma celular, donde alteran la expresión genética, promoviendo la supervivencia y la diferenciación neuronal (Oppenheim, 1989). La síntesis y liberación de NT's a nivel de los tejidos diana es aparentemente constitutiva (Barth et al., 1984), y no parece depender ni de la llegada de los axones neuronales al tejido diana de inervación ni del número en que lo hacen (Shelton y Reichardt, 1986b; Rohrer et al., 1988a; Lamb et al., 1989; Houenou et al., 1991). Este hecho significa que las NT's no están directamente implicadas en el crecimiento inicial y la posterior guía de los axones hacia sus dianas de inervación (Coughlin y Collins, 1985; Davies et al., 1987).

Las diferentes NT's guardan entre sí una estrecha relación a nivel estructural. Además del NGF, se incluyen en esta familia otras NT's como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT-3), la neurotrofina 4/5 (NT-4/5) y la neurotrofina 6 (NT-6). Más recientemente, se ha caracterizado una nueva NT, el factor neurotrófico derivado de la glía (*glial-cell-line-derived neurotrophic factor*, GDNF) que,

si bien no está emparentado estructuralmente con el resto de las NT's, sí parece reunir los diferentes criterios definitorios de las NT's.

La condición de que las NT's estén presentes en cantidades limitantes, puede ser lograda mediante el control de su producción o del acceso de las neuronas a ellas (Oppenheim, 1989). La primera posibilidad, denominada *hipótesis de la producción o de adecuación al tamaño*, establece que la producción de las NT's es limitada y está en función de la densidad de inervación (Korsching y Thoenen, 1983a; Heumann et al., 1984; O'Leary y Cowan, 1984; Shelton y Reichardt, 1984; Davies et al., 1987; Harper y Davies, 1990), siendo aparentemente gobernada por los niveles de ARNm de las diferentes NT's (Davies et al., 1987; Harper y Davies, 1990; Albers et al., 1994). Esta hipótesis explicaría la aparente relación de proporcionalidad y linealidad existente entre la supervivencia neuronal y la disponibilidad de tejidos diana (Wetts y Herrup, 1983; Habgood et al., 1984; O'Leary y Cowan, 1984; Maheras y Pollack, 1985; Lanser et al., 1986; Lamb et al., 1989; O'Brien y Oppenheim, 1990). No obstante, se ha comprobado que esta relación de proporcionalidad no siempre se mantiene cuando se aumenta (Oppenheim, 1981a, 1985; Lamb, 1984; Sperry y Grobstein, 1985; Sohal et al., 1986; Tanaka y Landmesser, 1986) o se reduce (Lamb, 1980; O'Leary y Cowan, 1984; Tanaka y Landmesser, 1986; Farel, 1989) la disponibilidad de los tejidos diana.

Una alternativa a la hipótesis de la producción es que esté limitado el acceso a las NT's y no su síntesis (Dahm y Landmesser, 1988; Oppenheim, 1989). De acuerdo con esta otra teoría, la *hipótesis del acceso*, en condiciones normales se producirían a nivel de los tejidos diana de inervación cantidades suficientes de las NT's para mantener vivas casi todas las neuronas inicialmente generadas, independientemente de la densidad de inervación (Tanaka, 1987;

Houenou et al., 1991). Un claro ejemplo de que la disponibilidad de factor neurotrófico no está limitada por su nivel de síntesis o producción es la observación de que una sola extremidad del anfibio *Xenopus laevis* es capaz de mantener vivas el doble del número normal de MTN's (Lamb, 1980; Denton et al., 1985; Dahm y Landmesser, 1988; Lamb et al., 1988; Oppenheim, 1989). Según la hipótesis del acceso, la accesibilidad de las neuronas a las NT's estaría limitada en función de la habilidad de las neuronas para ramificar sus terminales y formar un número suficiente de contactos con las células diana que permitiesen la captación de cantidades adecuadas de NT's.

Alternativamente, podrían existir variaciones en el número de lugares de liberación de factor(es) trófico(s) que presentan las células inervadas, así como en las cantidades liberadas de dicho(s) factor(es). De hecho, existen evidencias sólidas que sugieren que la actividad sináptica entre las neuronas y sus dianas de inervación condiciona una reducción de la disponibilidad de las actividades tróficas necesarias para la supervivencia neuronal (Hsu et al., 1982; Oppenheim et al., 1988; Oppenheim, 1989; revisado en Apartado 1.10).

La aparente simplicidad de la Teoría Neurotrófica se ve enturbiada por la existencia de una larga lista de agentes que, si bien no cumplen estrictamente los criterios para ser considerados NT's, también presentan propiedades neurotróficas. Tal es el caso de factores como el CNTF, el EGF, los FGF's y otros que se discutirán más adelante. No obstante, por las elevadas cantidades en que se encuentran, por la amplia distribución de las mismas o por la gran variedad de células sobre las que actúan, parecen ser incompatibles con un papel específico como moléculas neurotróficas, no estando ni mucho menos clara su relevancia durante el desarrollo embrionario. Estas moléculas probablemente tienen otras funciones aún no establecidas, o incluso podrían estar implicadas en condiciones fisiopatológicas. Asimismo, las aferencias, la glía y la matriz

extracelular constituyen una fuente significativa de agentes y/o actividades neurotróficas (revisado en Apartado 1.8).

Por último, hay que considerar la posibilidad de que la supervivencia neuronal durante el desarrollo embrionario también esté regulada por factores tóxicos o de muerte (*death factors*). Así, sería posible explicar el fenómeno de la muerte neuronal fisiológica en función de la capacidad de las neuronas supervivientes para neutralizar o evitar los efectos de un factor neurotóxico exógeno derivado de las dianas, aferencias u otros tipos celulares. De hecho, se ha comprobado como determinados agentes neurotróficos pueden promover tanto la supervivencia como la muerte neuronal (revisado en Apartado 2.4).

En conjunto, todas estas observaciones sugieren que la disponibilidad de factores neurotróficos puede estar regulada de forma distinta según la población neuronal. La existencia de diferencias intrínsecas o extrínsecas entre neuronas podría determinar que algunas células tengan una cierta ventaja competitiva sobre las demás para acceder a cantidades suficientes de las NT's y, por consiguiente, sobrevivir y diferenciarse normalmente (Hamburger y Oppenheim, 1982; Oppenheim, 1985).

2.2 Las neurotrofinas

2.2.1 El factor de crecimiento nervioso

El NGF es la primera y la mejor caracterizada molécula neurotrófica. En una serie de experimentos ya clásicos, Hamburger, Levi-Montalcini, Cohen y Bueker implantaron diferentes tipos de sarcomas

murinos en embriones de pollo con la finalidad de estudiar el fenómeno de dependencia periférica de las poblaciones neuronales durante el desarrollo embrionario. Sorprendentemente, encontraron un sarcoma, el 180, que al crecer era invadido por los nervios del embrión de pollo y provocaba una hiperplasia en los ganglios correspondientes. El mismo efecto era observado cuando el tumor era implantado sobre la membrana corioalantoidea, lo que indicaba que el responsable de este efecto paradójico tenía que ser un agente segregado por el tumor, capaz de atravesar la membrana corioalantoidea y de llegar hasta las neuronas del embrión a través de la circulación sanguínea (Bueker, 1948; Levi-Montalcini y Hamburger, 1951, 1953; Levi-Montalcini et al., 1954; Levi-Montalcini, 1987a). Esta sustancia teórica fue bautizada como NGF por Rita Levi-Montalcini y Viktor Hamburger.

Posteriormente, Rita Levi-Montalcini desarrolló el primer y más utilizado bioensayo para medir la actividad neurotrófica del NGF, consistente en la incubación de ganglios sensoriales o simpáticos de embriones de pollo en presencia de diluciones seriadas de medio con una cantidad desconocida de NGF (Cohen et al., 1954; Levi-Montalcini et al., 1954). Con este bioensayo como herramienta principal, se consiguió identificar el NGF y demostrar su presencia en una serie de tejidos, incluyendo el veneno de serpientes y las glándulas submaxilares de los ratones macho, en las que se encuentra en concentraciones muy elevadas (Cohen, 1960). Posteriormente, el NGF fue purificado a homogeneidad (Varon et al., 1967, 1968; Bocchini y Angeletti, 1969), tras lo cual fue posible producir anticuerpos, determinar su secuencia de aminoácidos (Angeletti y Bradshaw, 1971; Angeletti et al., 1973; Scott et al., 1983; Ullrich et al., 1983a, 1983b), establecer la estructura primaria de su precursor (Scott et al., 1983; Ullrich et al., 1983a, 1983b; Ebendal et al., 1986; Selby et al., 1987) y conocer, mediante técnicas de genética molecular, la organización del gen del NGF (Scott et al., 1983; Ullrich et al., 1983a, 1983b; Ebendal et al., 1986; Meier et al., 1986; Wion et al.,

1986; Selby et al., 1987; Levi-Montalcini, 1987b; Barde, 1989; Schwarz et al., 1989).

El NGF aislado a partir de las glándulas salivales del ratón macho es un complejo 7S formado por tres subunidades (α , β y γ), en una proporción $2\alpha:1\beta:2\gamma$ y con un peso molecular de ~ 140 kDa (Varon et al., 1967, 1968; Smith et al., 1969). La subunidad β es un dímero no covalente pero muy estable, compuesto por dos cadenas polipeptídicas, cada una de ellas con 118 aminoácidos y un peso molecular de 13,3 kDa (Angeletti et al., 1971; Greene et al., 1971; Harper y Thoenen, 1980), y con elevado grado de conservación a nivel de secuencia entre diferentes especies (Scott et al., 1983; Ullrich et al., 1983a, 1983b; Ebendal et al., 1986; Goedert, 1986; Meier et al., 1986; Misko et al., 1987; Whittemore et al., 1988a; Schwarz et al., 1989). De las tres subunidades que constituyen el complejo 7S, sólo la subunidad β tiene actividad promotora del crecimiento neuronal, correspondiéndose por su coeficiente de sedimentación con la forma 2,5S (Varon et al., 1967; Greene et al., 1971). Esta forma 2,5S, que difiere de la subunidad β por la ausencia de nueve aminoácidos en una de la dos cadenas polipeptídicas (Greene et al., 1971; Harper y Thoenen, 1980), es la fracción que se prepara según el método de Bocchini y Angeletti (1969).

La subunidad α , con un peso molecular de 26 kDa, presenta un alto grado de homología con la familia de la kalicreína (Isackson et al., 1984, 1987), por lo que se le ha atribuído una función protectora contra supuestos ataques enzimáticos dirigidos a la subunidad β (Greene et al., 1969). Por último, la subunidad γ , con un peso molecular similar al de la subunidad α , es una esteropeptidasa arginina-específica (Varon et al., 1968; Thomas et al., 1981; Evans y Richards, 1985) que cataliza el paso de una molécula precursora conocida como pro- β al monómero de la

subunidad β (Greene et al., 1968, 1969; Levi-Montalcini y Angeletti, 1968; Moore et al., 1974; Berger y Shooter, 1977; Greene y Shooter, 1980).

A lo largo de los últimos 35-40 años, una infinidad de grupos de investigación han demostrado experimentalmente la implicación del NGF en la regulación de una variedad de procesos del desarrollo embrionario, como la supervivencia neuronal durante el período de muerte fisiológica, la diferenciación neuronal, el crecimiento neurítico y axonal y la reorganización sináptica (Thoenen y Barde, 1980; Hamburger et al., 1981; Hamburger y Yip, 1984; Doupe et al., 1985; Purves y Lichtman, 1985; Davies et al., 1987; Purves et al., 1988). Se han detectado niveles significativos de ARNm para NGF en el cerebro, los ganglios simpáticos y la médula espinal en buena correlación con los niveles de proteína (Shelton y Reichardt, 1984; Körsching et al., 1985; Goedert et al., 1986; Large et al., 1986; Rennert y Heindrich, 1986; Heumann et al., 1984, 1987a; Auburger et al., 1987; Ayer-LeLievre et al., 1988; Lu et al., 1989).

2.2.1.1 El NGF y el sistema nervioso periférico

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, es muy llamativo el efecto promotor de la supervivencia del NGF sobre determinadas poblaciones neuronales del SNP, como son las neuronas simpáticas y sensoriales de los ganglios espinales. En el caso de las neuronas simpáticas, se ha demostrado que la administración exógena de NGF disminuye el número de las que mueren durante el período de muerte neuronal fisiológica, produciéndose una marcada hipertrofia del sistema simpático periférico (Levi-Montalcini y Angeletti, 1968; Aloe et al., 1975; Oppenheim et al., 1982a). Por contra, al exponer animales neonatales o fetales a un suero anti-NGF, se consigue la eliminación de casi la totalidad de las neuronas simpáticas (Levi-Montalcini y Booker, 1960; Levi-Montalcini y Angeletti, 1966; Gorin y Johnson, 1979, 1980a,

1980b; Johnson et al., 1980; Aloe et al., 1981). Las neuronas simpáticas pueden ser mantenidas en cultivo con NGF (Levi-Montalcini y Angeletti, 1963; Greene, 1977a; Chun y Patterson, 1977a, 1977b; Berg, 1982), incluso cuando dicha NT es suministrada exclusivamente a los terminales nerviosos (Campenot, 1977). También es posible revertir los cambios degenerativos en ganglios simpáticos tras la axotomía postganglionar mediante la administración de NGF (Aloe et al., 1975; Hendry, 1975a, 1975b; Hendry y Campbell, 1976).

Las neuronas sensoriales de los ganglios espinales también son claramente sensibles al NGF. La administración sistémica de NGF durante el desarrollo embrionario aumenta su supervivencia (Hamburger et al., 1981), mientras que la privación de NGF conlleva una severa deplección de neuronas ganglionares (Levi-Montalcini y Booker, 1960; Levi-Montalcini y Angeletti, 1966; Gorin y Johnson, 1979, 1980a, 1980b; Johnson et al., 1980; Aloe et al., 1981). Como en el caso de las neuronas simpáticas, el NGF evita la muerte de neuronas sensoriales de los ganglios espinales inducida por axotomía (Yip et al., 1984; Rich et al., 1984, 1987). También es necesario para la supervivencia y el desarrollo de neuronas de los ganglios espinales disociadas en cultivos celulares (Levi-Montalcini y Angeletti, 1963; Greene, 1977a).

In vivo, el NGF puede ser captado con un alto grado de especificidad por los terminales nerviosos de las neuronas simpáticas y de los ganglios espinales, y transportado retrógradamente hasta el soma celular (revisado en Apartado 3.4). Lógicamente, la interrupción mecánica del transporte axonal retrógrado o la utilización de agentes farmacológicos que interfieren con la captación terminal del NGF tienen las mismas consecuencias que la administración de anticuerpos anti-NGF: una disfunción neuronal significativa y la correspondiente degeneración neuronal (Angeletti y Levi-Montalcini, 1970; Hendry, 1975b; Dibner y Black, 1976; Hendry y Campbell, 1976; Purves, 1976; Dibner et

al., 1977; Menesini-Chen et al., 1977; Johnson, 1978; Harper y Thoenen, 1981; Schwab et al., 1982; Verge et al., 1989).

El NGF también tiene un importante efecto estimulador de la diferenciación neuronal durante el desarrollo embrionario y en la edad adulta. Las neuronas sensoriales de los ganglios espinales emiten una profusión de neuritas en respuesta al tratamiento con NGF *in vitro* (Cohen et al., 1954; Levi-Montalcini et al., 1954; Fukuda y Yamaguchi, 1982; Fukuda, 1985; Grothe y Unsicker, 1987; Lindsay, 1988; Yasuda et al., 1990; Horie et al., 1991; Jiang y Smith, 1993; Jiang et al., 1995; Mohiuddin et al., 1995). El NGF controla localmente el grado y la dirección del crecimiento y ramificación de los axones y de la arborización dendrítica, propiciando el crecimiento o retracción de las neuritas en función de su concentración local (Menesini-Chen et al., 1978; Gundersen y Barrett, 1979, 1980; Campenot, 1977, 1982; Snider, 1988; revisado por: Ruit et al., 1990; Saffran y Crutcher, 1990). Asimismo, el NGF estimula la síntesis de proteínas del neurofilamento (Verge et al., 1989, 1990; Gold et al., 1991; Mohiuddin et al., 1995) e induce la actividad enzimática de la tirosina hidroxilasa en las células neuronales (Paravicini et al., 1975; Hendry, 1977). Por último, el NGF estimula la migración de las células de Schwann en los nervios periféricos durante el desarrollo embrionario y en proceso de regeneración (Anton et al., 1994).

Como corresponde a una NT, el NGF y su ARNm están presentes en el tejido de inervación de las neuronas del SNP dependientes de NGF, incluyendo el *vas deferens* y los testículos, el corazón, el hígado, el tejido muscular esquelético, el iris, la piel, la cápsula esplénica, el nervio ciático, la glándula submaxilar y las glándulas adrenales (Korsching y Thoenen, 1983a; Heumann et al., 1984; Shelton y Reichardt, 1984; Heumann, 1987). No obstante, ha sido tradicionalmente difícil obtener información sobre la síntesis y los niveles de NGF en los tejidos. Las concentraciones de NGF en los tejidos diana de inervación de las neuronas simpáticas y

sensoriales, se encuentran en el rango de 1-4 ng/g de tejido diana, mientras que en tejidos con menor grado de inervación simpática y/o sensorial, los niveles de NGF son inferiores al umbral de detección (~0,3 ng/g de tejido), (Ebendal et al., 1980; Korsching y Thoenen, 1983a; Davies et al., 1987; Harper y Davies, 1990; Albers et al., 1994). También se ha comprobado la presencia de ARNm para NGF en las dianas de inervación simpática y sensorial, aunque no en otros tejidos sin dicha inervación (Korsching y Thoenen, 1983a; Shelton y Reichardt, 1984; Davies et al., 1987; Harper y Davies, 1990).

2.2.1.2 El NGF y el sistema nervioso central

En el SNC, el NGF actúa sobre las neuronas colinérgicas de los núcleos de la base. Estas neuronas expresan receptores para NGF (Hefti et al., 1986; Richardson et al., 1986; Taniuchi et al., 1986a; Raivich y Kreutzberg, 1987b; Schatteman et al., 1988) y son capaces de transportar retrógradamente dicha NT (Seiler y Schwab, 1984) a partir de sus dianas de inervación, el hipocampo y el neocórtex (Korsching et al., 1985; Large et al., 1986; Shelton y Reichardt, 1986a; Whittemore et al., 1986; Auburger et al., 1987; Whittemore y Seiger, 1987). El NGF bloquea la muerte de estas neuronas tanto *in vitro* (Hsiang et al., 1989) como la inducida por axotomía (Hefti, 1986; Williams et al., 1986; Kromer, 1987; Koliatsos et al., 1990; Tuszynski et al., 1990). También estimula la regeneración neurítica y la expresión de marcadores colinérgicos y, por tanto, la diferenciación de estas neuronas *in vitro* e *in vivo* (Honegger y Lenoir, 1982; Gnahn et al., 1983; Hefti et al., 1984, 1985; Mobley et al., 1985, 1986; Goedert et al., 1986; Johnston et al., 1987; Martínez et al., 1987; Hartikka y Hefti, 1988a, 1988b; Hatanaka et al., 1988; Vantini et al., 1989; Hagg et al., 1990).

En el cuerpo estriado hay un grupo de neuronas colinérgicas sensibles al NGF. Presentan receptores para NGF (Schatteman et al., 1988) y responden a esta NT durante el desarrollo embrionario con un incremento en marcadores colinérgicos *in vitro* e *in vivo* (Martínez et al., 1985, 1987; Mobley et al., 1985, 1986; Johnston et al., 1987; Hartikka y Hefti, 1988b). Asimismo, el NGF controla la proliferación y la diferenciación de las células precursoras del cuerpo estriado durante el desarrollo embrionario (Cattaneo y McKay, 1990).

Aunque tradicionalmente se ha aceptado que las MTN's espinales no dependen para su supervivencia del NGF (Oppenheim et al., 1982a, 1988; Miyata et al., 1986; Dohrmann et al., 1987; Yan et al., 1988), hay una serie de datos algo dispersos en la literatura que evidencian que las MTN's son capaces de responder al NGF, aunque de forma limitada. De hecho, las MTN's del tronco encefálico y de la médula espinal presentan receptores de baja afinidad para el NGF en su superficie (Raivich et al., 1985; Yan y Johnson, 1988; Yan et al., 1988; Ernfors et al., 1988, 1989), pudiendo interactuar con esta NT (Raivich et al., 1985, 1987) así como transportarla retrógradamente durante el desarrollo embrionario (Wayne y Heaton, 1988, 1990b). *In vitro*, el NGF puede estimular el crecimiento neurítico de las MTN's (Wayne y Heaton, 1990a). Por otra parte, Oppenheim et al. (1992) han demostrado que esta NT puede bloquear la pérdida de MTN's que se observa tras la desafrenciación central de estas células neuronales (Okado y Oppenheim, 1984).

En el SNC, la expresión del ARNm para NGF se localiza principalmente en las regiones invadas por las neuronas colinérgicas sensibles al NGF, especialmente en el hipocampo y el neocórtex (Körsching et al., 1985; Shelton y Reichardt, 1986a; Ayer-Lelievre et al., 1988; Whittemore et al., 1986, 1988b; Söderström y Ebendal, 1995). Como en el SNP, también existe una sólida correlación entre los niveles de ARNm para NGF y la densidad de invasión de las neuronas

colinérgicas (Körsching et al., 1985). En el embrión de pollo es posible detectar en el SNC niveles relativamente elevados de ARNm para NGF así como para su receptor en estadios embrionarios precoces previos a la inervación neuronal (Ebendal y Persson, 1988; Ernfors et al., 1988; Hallböök et al., 1990; Heuer et al., 1990a, 1990b), apuntando que el NGF podría tener una función diferente a la de regulador del proceso de muerte neuronal fisiológica durante las fases precoces del desarrollo embrionario del SNC.

2.2.2 *El factor neurotrófico derivado de cerebro*

El BDNF fue descubierto accidentalmente a partir de un medio de cultivo condicionado por una línea de células gliales (Barde et al., 1978, 1980). Posteriormente, tras comprobarse su presencia en extractos de cerebro de cerdo, fue aislado, siendo necesario un factor de purificación de $1:>1.000.000$ (Barde et al., 1982). A continuación, fue posible elucidar su estructura primaria (Leibrock et al., 1989) y, poco tiempo después, conseguir su clonación (Leibrock et al., 1989; Hofer et al., 1990; Hallböök et al., 1991; Isackson et al., 1991a; Rosenthal et al., 1991). Se trata de una proteína básica de 119 aminoácidos y 12,3 kDa de peso molecular, con un precursor de 252 aminoácidos y un grado de homología con el NGF respecto a su composición en aminoácidos próximo al 55% (Leibrock et al., 1989).

El BDNF ejerce claros efectos neurotróficos sobre diversas poblaciones neuronales, como ciertas subpoblaciones de neuronas sensoriales craneales -como las del ganglio nodoso- y de los ganglios espinales que no responden al NGF (Barde et al., 1982; Lindsay, 1985; Lindsay et al., 1985; Davies y Lindsay, 1986; Davies et al., 1986; Wright et al., 1992). Estudios *in vivo* han demostrado que el proceso de muerte neuronal fisiológica en los ganglios nodosos y espinales puede ser bloqueado en gran medida mediante la administración exógena de BDNF

(Hofer y Barde, 1988). Asimismo, el BDNF estimula la diferenciación de células de la cresta neural hacia un fenotipo sensorial (Sieber-Blum, 1991). Las células del *tectum* óptico (Herzog et al., 1994), las células ganglionares de la retina tanto embrionarias (Johnson et al., 1986b; Barde, 1989; Rodríguez-Tébar et al., 1989; Thanos et al., 1989; Cohen-Cory y Fraser, 1994) como adultas (Mey y Thanos, 1993; Mansour-Robaey et al., 1994), las neuronas corticales (Nawa et al., 1993), las neuronas granulosas del cerebelo (Segal et al., 1992; Gao et al., 1995; Kubo et al., 1995), las neuronas GABAérgicas centrales (Knüsel et al., 1991; Hyman et al., 1994; Ventimiglia et al., 1995), las neuronas del hipocampo (Ip et al., 1993c) y las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas -de la *substantia nigra*- (Knüsel et al., 1991; Hyman et al., 1991, 1994; Martin-Iverson et al., 1994) también responden al BDNF.

Por otra parte, las neuronas colinérgicas de los núcleos de la base responden tanto al BDNF como al NGF (Alderson et al., 1990, 1993; Knüsel et al., 1991). Las MTN's espinales, corticoespinales y de los núcleos craneales son sensibles al BDNF *in vitro* e *in vivo*, tanto durante el desarrollo embrionario (Oppenheim et al., 1992a, 1993; Henderson et al., 1993a; Hughes et al., 1993b; Wong et al., 1993; Zurn et al., 1996) como en las edades neonatal y adulta (Sendtner et al., 1992a; Yan et al., 1992, 1993, 1994; Koliatsos et al., 1993; Clatterbuck et al., 1994; Li et al., 1994; Friedman et al., 1995; Ikeda et al., 1995b; Novikov et al., 1995; Vejsada et al., 1995; Giehl y Tetzlaff, 1996). Por último, recientemente se ha descrito cómo subpoblaciones de células gliales del SNC responden al BDNF (Roback et al., 1995).

La gran mayoría de las neuronas que responden al BDNF se localizan o se proyectan en el SNC (Barde, 1989). En buena lógica, el BDNF y su ARNm se encuentran predominantemente a nivel del encéfalo y de la médula espinal (Leibrock et al., 1989; Ernfors et al., 1990a; Hofer et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990a, 1990b; Phillips et al., 1990;

Wetmore et al., 1990, 1991; Rosenthal et al., 1991; Hallböök et al., 1993; Herzog et al., 1994). Entre las regiones que expresan ARNm para BDNF se encuentran el *gyrus* dentado, la amígdala, las áreas de proyección del sistema olfatorio, las capas piramidales del neocórtex, los colículos superiores, la retina, el *claustrum* y el cerebelo. El hipocampo es la zona del cerebro que presenta cantidades más elevadas de ARNm para BDNF (Hofer et al., 1990). Se ha estimado que la concentración local de BDNF en el tejido cerebral es de ~5 ng/g (Hofer y Barde, 1988), basándose en el reducido nivel de expresión de ARNm para BDNF en el cerebro de los mamíferos (Hofer et al., 1990; Hallböök et al., 1993) y el elevado factor de purificación necesario para obtener el BDNF a partir de extractos de cerebro de cerdo (Barde et al., 1982).

2.2.3 La neurotrofina 3

Pocos meses después de conocerse la secuencia genómica del BDNF, un tercer miembro de la familia de las NT's, la NT-3, fue identificado simultáneamente por diferentes laboratorios (Ernfors et al., 1990b; Hohn et al., 1990; Jones y Reichardt, 1990; Kaisho et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990a; Rosenthal et al., 1990). La NT-3 fue la primera NT identificada mediante técnicas de Biología Molecular, sin necesidad de purificar previamente la proteína nativa. La NT-3 presenta muchas analogías estructurales con el NGF y el BDNF (Thoenen, 1991); se trata de un polipéptido cuya forma madura consta de 119 aminoácidos y se genera a partir de un precursor con péptido señal de 258 aminoácidos (Maisonpierre et al., 1990a). La NT-3 madura tiene una identidad en su secuencia de aminoácidos del 57% y 58% con el NGF y el BDNF, respectivamente, lo que supone una homología del 48% entre las tres moléculas.

No obstante, la NT-3 difiere del NGF y del BDNF en su patrón de expresión regional (Ernfors et al., 1990b; Maisonpierre et al., 1990b; Hohn et al., 1990; Rosenthal et al., 1990; Wetmore et al., 1990; Hallböök et al., 1993). Se ha observado que los transcritos de ARNm para NT-3, a diferencia de los de NGF y BDNF, se producen en cantidades muy elevadas a nivel de diferentes tejidos periféricos como el corazón, los riñones, el bazo y, en menor medida, la piel, el músculo esquelético, los pulmones, el intestino, el hígado, el timo, la placenta, los ovarios y las glándulas adrenales. En el SNC, la expresión es mucho más reducida, aunque predomina en el hipocampo y el cerebelo (Ernfors et al., 1990a, 1990b; Hohn et al., 1990; Kaisho et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990a, 1990b; Rosenthal et al., 1990; Friedman et al., 1991; Ernfors et al., 1992; Hallböök et al., 1993; Rocamora et al., 1993; Söderström y Ebendal, 1995).

La información disponible sobre las acciones biológicas de la NT-3 es limitada, en parte debido a la necesidad de trabajar con NT-3 recombinante y a que hasta hace muy poco no existían anticuerpos anti-NT-3. Hasta la fecha, se han identificado varias poblaciones neuronales embrionarias capaces de responder a la NT-3, como las neuronas sensoriales de los ganglios espinales (Ernfors et al., 1990b; Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990a; Hory-Lee et al., 1993; Gaese et al., 1994; Zhang et al., 1994a; Mohiuddin et al., 1995; Oakley et al., 1995) y de los ganglios craneales (Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990a; Rosenthal et al., 1990; Gaese et al., 1994). Se ha sugerido que la NT-3 y el BDNF actúan sobre subpoblaciones de neuronas sensoriales craneales diferentes, ya que sus efectos son aditivos (Hohn et al., 1990). Estas observaciones junto con el patrón de expresión tisular, sugieren que la NT-3 es probablemente responsable del mantenimiento de las neuronas propioceptivas que proyectan hacia el músculo esquelético y las neuronas somatosensoriales del ganglio nodoso.

La NT-3 también ejerce efectos neurotróficos, aunque menos marcados que los del NGF, sobre las neuronas simpáticas (Maisonpierre et al., 1990a; Dechant et al., 1993a). Durante el desarrollo embrionario precoz, la NT-3 estimula la proliferación y la supervivencia de los neuroblastos simpáticos (Coughlin y Collins, 1985; Birren et al., 1993; Dechant et al., 1993a; DiCicco-Bloom et al., 1993; Vogel, 1994; Verdi et al., 1996). Por último, la NT-3 también parece actuar sobre las neuronas colinérgicas de los ganglios basales sensibles al NGF (Friedman et al., 1993), las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* fetal y las neuronas dopaminérgicas del hipocampo embrionario y adulto (Collazo et al., 1992; Friedman et al., 1993; Arenas y Persson, 1994; Hyman et al., 1994), las neuronas GABAérgicas mesencefálicas (Hyman et al., 1994; Ventimiglia et al., 1995) y las células amacrinas y ganglionares de la retina (De la Rosa et al., 1994; Bovolenta et al., 1996). Las neuronas granulosas del córtex cerebeloso muestran una discreta respuesta de supervivencia a la NT-3 (Kubo et al., 1995), cuyo significado biológico es aún incierto, mientras que las células de Purkinje del cerebelo se diferencian en respuesta a la NT-3 (Lindholm et al., 1993).

La NT-3 también estimula *in vitro* e *in vivo* la supervivencia y diferenciación de las MTN's espinales embrionarias (Henderson et al., 1993a; Hughes et al., 1993b; Wong et al., 1993), neonatales y adultas (Sendtner et al., 1992a; Yan et al., 1993; Li et al., 1994; Vejsada et al., 1995; Giehl y Tetzlaff, 1996). Por último, la NT-3 estimula la proliferación de las células precursoras de oligodendrocitos (Barres et al., 1994) y la diferenciación neuronal y glial de las células precursoras del sistema nervioso entérico (SNE) derivadas de la cresta neural (Chalazonitis et al., 1994).

2.2.4 La neurotrofina 4/5

Más recientemente, mediante una estrategia de búsquedas de PCR utilizando las regiones conservadas de las NT's NGF, BDNF y NT-3, se aisló en el genoma de *Xenopus* un nuevo miembro de la familia de las NT's denominado neurotrofina 4 (NT-4) (Hallböök et al., 1991). La forma madura de esta NT es un polipéptido de 123 aminoácidos, generado a partir de un precursor de 236 aminoácidos, con un 51-60% de identidad con las otras NT's. Paradójicamente, la expresión de la NT-4 en los tejidos de *Xenopus* está restringida a los ovarios (Hallböök et al., 1991). Posteriormente, Ip et al. (1992a), de nuevo mediante una estrategia de PCR, identificaron en el genoma de mamíferos una secuencia homóloga a la de la NT-4 de *Xenopus*, que denominaron NT-4 mamífera. Curiosamente, a pesar de que la NT-4 mamífera está más relacionada con la NT-4 de *Xenopus* que con cualquier otra NT, el grado de identidad interespecífica es sólo del 65%, mucho menor que el habitual para las otras NT's (~99%). La NT-4 mamífera, a diferencia de la NT-4 de *Xenopus*, está presente de forma limitada en una variedad de tejidos, como la próstata (donde alcanza su mayor nivel de expresión), el timo, la placenta, el músculo esquelético y los testículos (Ip et al., 1992a).

Poco tiempo después de aislarse la NT-4 de *Xenopus*, otro grupo investigador aisló en el genoma de los mamíferos la secuencia génica de una nueva NT, que denominaron neurotrofina 5 (NT-5) (Berkemeier et al., 1991), la cual presenta un 50-60% de homología a nivel de secuencia genómica con el NGF, el BDNF y la NT-3 (Berkemeier et al., 1991). La sorpresa surgió cuando, al comparar las secuencias de aminoácidos de la NT-5 y la NT-4 mamífera, se comprobó que ambas NT's eran idénticas (Ip et al., 1995). Al estudiar el patrón de expresión de ARNm para NT-5, se comprobó que, mientras que la NT-4 mamífera está limitada a unos pocos tejidos periféricos, la NT-5 está presente en más regiones, entre las que

se incluyen el cerebro, el corazón, los pulmones, el riñón, el estómago, los ovarios, el músculo y el timo (Berkemeier et al., 1991). No obstante, el hecho de la identidad de secuencias aminoacídicas y la posterior comprobación de que la actividad biológica de la NT-4 de *Xenopus*, la NT-4 mamífera y la NT-5 es equivalente, ha propiciado que la comunidad científica hable desde entonces de la NT-4/5.

La actividad biológica de la NT-4/5 es similar a la del BDNF, aunque existen algunas diferencias entre ambas NT's. La NT-4/5 ejerce acciones tróficas sobre las neuronas sensoriales de los ganglios espinales y nodosos en cultivo, pero no de forma significativa sobre las neuronas simpáticas (Berkemeier et al., 1991; Hallböök et al., 1991; Ip et al., 1992a). Asimismo, en el SNC la NT-4/5 aumenta la supervivencia de las neuronas colinérgicas y noradrenérgicas embrionarias (Alderson et al., 1993; Friedman et al., 1993; Hyman et al., 1994; Hynes et al., 1994), las neuronas GABAérgicas mesencefálicas (Hyman et al., 1994; Ventimiglia et al., 1995), las neuronas del *locus coeruleus* fetal (Friedman et al., 1993), las células ganglionares de la retina (Cui y Harvey, 1994) y las neuronas granulosas del córtex cerebeloso (Gao et al., 1995; Kubo et al., 1995). También puede actuar como una señal neurotrófica para las MTN's neonatales, adultas (Hughes et al., 1993b; Koliatsos et al., 1994; Li et al., 1994; Friedman et al., 1995; Funakoshi et al., 1995; Schmalbruch y Rosenthal, 1995; Vejsada et al., 1995) y embrionarias (Henderson et al., 1993a; Hughes et al., 1993b; Oppenheim et al., 1993; Wong et al., 1993).

2.2.5 La neurotrofina 6

Recientemente, se ha descrito la clonación de una nueva NT, la NT-6, a partir del pez teleosteo *Xiphophorus* (Gotz et al., 1994). La NT-6 se diferencia de las otras NT's conocidas porque no se puede aislar como una proteína soluble en el medio de cultivo de las células que lo

producen. Sin embargo, la adición de heparina propicia la liberación de NT-6 de la superficie celular y de la matriz extracelular (Gotz et al., 1994). La NT-6 tiene un espectro de acciones similar al del NGF -aunque menos potente- al actuar sobre las neuronas simpáticas y sensoriales de pollo (Gotz et al., 1994). Esta nueva NT se expresa principalmente en el cerebelo embrionario, aunque su expresión persiste en algunos tejidos adultos (Gotz et al., 1994).

2.2.6 La estructura de las neurotrofinas

El esclarecimiento de la estructura de las NT's es una de las áreas en las que más se ha avanzado en los últimos años (revisado por: Ibáñez, 1994). A concentraciones fisiológicas, las NT's forman dímeros no covalentes entre sí (Angeletti et al., 1971; McDonald et al., 1991) que, según se ha comprobado a partir de estudios de cristalización (McDonald et al., 1991; Fandl et al., 1994), se establecen a través de la interacción entre núcleos hidrofóbicos presentes en cada uno de los monómeros. El núcleo hidrofóbico de cada monómero está condicionado por la existencia de una serie de aminoácidos, entre los que se incluyen seis residuos de cisteína que forman a su vez tres puentes disulfuro, indispensables para la estabilidad de la estructura tridimensional de la NT (McDonald et al., 1991; Fandl et al., 1994) así como para su actividad biológica (Thoenen y Barde, 1980).

Los seis residuos de cisteína están altamente conservados entre las distintas NT's (Leibrock et al., 1989; Maisonpierre et al., 1990a; Berkemeier et al., 1991; Hallböök et al., 1991; Ip et al., 1992a), lo que sugiere que las diferentes NT's probablemente comparten una estructura tridimensional similar (McDonald et al., 1991). Por otra parte, mediante experimentos de mutagénesis dirigida y el diseño de NT's quiméricas recombinantes, ha sido posible localizar las regiones del NGF (Ibáñez et al., 1990, 1991, 1992, 1993; McDonald et al., 1991; Kahle et al., 1992;

Shih et al., 1994; Treanor et al., 1995; Woo et al., 1995), del BDNF (Rosenfeld et al., 1993), de la NT-3 (Urfer et al., 1994) y de la NT-4/5 (Treanor et al., 1995) implicadas en la interacción con sus respectivos receptores de alta y baja afinidad.

2.2.7 *El GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor)*

El GDNF es un homodímero glicosilado con un peso molecular aproximado de 33-45 kDa, siendo considerado un miembro lejano de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β) (Lin et al., 1993a). Fue purificado y clonado a partir del medio condicionado por la línea celular glial de rata B49, en base a sus efectos de supervivencia y diferenciación sobre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo *in vitro* (Engele et al., 1991; Lin et al., 1993, 1994; Hudson et al., 1995; Trupp et al., 1995) e *in vivo* (Beck et al., 1995; Tomac et al., 1995; Choi-Lundberg et al., 1997). De hecho, se ha sugerido que el GDNF podría actuar como factor neurotrófico derivado de diana para las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo en base al patrón de expresión de su ARNm a nivel del cuerpo estriado embrionario (Schaar et al., 1993; Strömberg et al., 1993; Poulsen et al., 1994; Springer et al., 1994; Choi-Lundberg y Bohn, 1995). Asimismo, el GDNF podría mediar en la respuesta de las neuronas dopaminérgicas a la lesión (Humpel et al., 1994; Kearns y Gash, 1995; Tomac et al., 1995; Choi-Lundberg et al., 1997).

Recientemente han aparecido diversos trabajos (Henderson et al., 1994; Mitsumoto et al., 1994a; Zurn et al., 1994; Li et al., 1995b; Oppenheim et al., 1995; Yan et al., 1995; Zurn et al., 1994, 1996; Bowenkamp et al., 1996; Houenou et al., 1996; Sagot et al., 1996) que indican que el GDNF también tiene importantes efectos neurotróficos de supervivencia y diferenciación *in vivo* e *in vitro* sobre las MTN's espinales,

tanto durante el desarrollo embrionario como en la edad adulta. En el caso de las neuronas sensoriales, aparentemente no existe una respuesta de supervivencia (Henderson et al., 1994; Oppenheim et al., 1995), aunque sí son capaces de transportar retrógradamente el GDNF (Yan et al., 1995). Por otra parte, existen datos contradictorios sobre los efectos del GDNF sobre la neuritogénesis y la supervivencia de las neuronas simpáticas y del ganglio ciliar (Henderson et al., 1994; Buj-Bello et al., 1995; Ebendal et al., 1995; Oppenheim et al., 1995; Trupp et al., 1995; Yan et al., 1995). Curiosamente, en animales carentes de GDNF se aprecian déficits significativos a nivel de las neuronas de los ganglios espinales, simpáticos y nodosos y de las MTN's espinales, aunque no a nivel de las poblaciones neuronales noradrenérgicas y dopaminérgicas del mesencéfalo. También se observa una desaparición total del SNE (Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sánchez et al., 1996).

Además de en el cuerpo estriado, también se ha detectado expresión del ARNm para GDNF en otras estructuras neuronales del SNC, como el hipocampo, el córtex, el cerebelo y la médula espinal (Schaar et al., 1993; Strömberg et al., 1993; Poulsen et al., 1994; Springer et al., 1994; Choi-Lundberg y Bohn, 1995; Trupp et al., 1995). Asimismo, se ha detectado la expresión de GDNF en una gran variedad de tejidos periféricos -esbozos de extremidades, músculo esquelético, riñón, tracto gastrointestinal, pulmón, gónadas, hígado -, por lo que se ha sugerido que el GDNF podría tener una posible función neurotrófica a nivel del SNP o incluso actuar como factor trófico para células no neuronales (Choi-Lundberg y Bohn, 1995; Trupp et al., 1995; Suvanto et al., 1996). De hecho, en animales que no expresan GDNF se aprecian alteraciones considerables a nivel de los riñones y el aparato urogenital (Moore et al., 1996).

Recientemente se ha purificado y clonado un nuevo factor neurotrófico, denominado neurturina (Kotzbauer et al., 1996). Este factor,

relacionado estructuralmente con el GDNF, fue identificado en base a su capacidad de estimular la supervivencia *in vitro* de neuronas simpáticas y sensoriales.

2.3 Otros factores neurotróficos distintos de las neurotrofinas

2.3.1 El factor neurotrófico ciliar

El CNTF de los mamíferos es una proteína ácida de ~25 kDa de peso molecular (Rudge et al., 1987) con un elevado grado de conservación de su secuencia de aminoácidos entre las diferentes especies de mamíferos (Leung et al., 1992) y que no muestra ninguna homología estructural con la familia de las NT's (Lin et al., 1989; Stöckli et al., 1989). En el pollo, la molécula homóloga al CNTF de los mamíferos se ha denominado GPA (de *growth-promoting activity*), constituyendo un caso especial ya que sólo presenta un grado de identidad del 50% con la secuencia de aminoácidos del CNTF de los mamíferos (Leung et al., 1992). El CNTF fue inicialmente identificado, parcialmente purificado y clonado a partir de extractos de tejido ocular de pollo (Adler et al., 1979a; Barbin et al., 1984; Eckenstein et al., 1990; Leung et al., 1992), posteriormente a partir del nervio ciático de la rata adulta (Manthorpe et al., 1986a; Lin et al., 1989; Stöckli et al., 1989) y del conejo (Lin et al., 1990), del corazón de los bovinos (Watters y Hendry, 1987) y, más recientemente, de los humanos (Lam et al., 1991; Masiakowski et al., 1991; Negro et al., 1991).

En la actualidad, se sabe que el CNTF, junto con el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la oncostatina M, la interleukina 6 (IL-6) y el G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), forma parte de una familia de citocinas con similitud estructural entre sí y que presentan acciones biológicas sobre células neuronales y hemopoyéticas (Bazan, 1991; Davis

et al., 1991). Los miembros de esta familia de citokinas, aunque en general tienen un grado de homología algo menor del 30%, poseen una misma estructura helicoidal con puentes disulfuro y dominios carboxi-terminales similares (Bazan, 1991). Una región adicional, el motivo D2 neuroespecífico, es compartido por el CNTF, por el LIF y por la oncostatina M, distinguiendo las neuroquinas de otras citokinas hemopoyéticas (Bazan, 1991).

El CNTF/GPA fue descrito inicialmente como la molécula neurotrófica que controla el crecimiento neurítico y la supervivencia de las neuronas parasimpáticas del ganglio ciliar en cultivo (Adler et al., 1979a; Barbin et al., 1984; Manthorpe et al., 1986a; Lin et al., 1989; Stöckli et al., 1989) y, en el caso del embrión de pollo, durante el período de muerte neuronal fisiológica *in vivo* (Leung et al., 1992). Posteriormente, se ha demostrado que el espectro de acción de este factor es mucho más amplio. El CNTF estimula la supervivencia *in vitro* y/o *in vivo* de neuronas simpáticas y sensoriales (Barbin et al., 1984; Ernsberger et al., 1989a; Eckenstein et al., 1990; Burnham et al., 1994), de neuronas del hipocampo y del *locus coeruleus*, y de neuronas mesencefálicas dopaminérgicas (Ip et al., 1991; Hagg et al., 1992; Hagg y Varon, 1993; Louis et al., 1993a; Magal et al., 1993; Wen et al., 1995).

El CNTF también es capaz de promover la supervivencia de las MTN's espinales tanto *in vitro* (Arakawa et al., 1990) como *in vivo* (Sendtner et al., 1990; Wewetzer et al., 1990; Oppenheim et al., 1991; Masu et al., 1993; Vejsada et al., 1995). Se ha demostrado la capacidad de las MTN's para transportar el CNTF de forma retrógrada (Curtis et al., 1993). Asimismo, el CNTF promueve la supervivencia de neuronas simpáticas preganglionares privadas de su diana (Blottner et al., 1989) así como de las células de la médula adrenal (Tokiwa et al., 1994). Además de su efecto promotor de la supervivencia neuronal, el CNTF

estimula la diferenciación neuronal. En las neuronas simpáticas induce la diferenciación colinérgica (Saadat et al., 1989; Doering et al., 1995) y regula la expresión de neuropéptidos (Rao et al., 1992). En las MTN's, el CNTF parece actuar sobre el *sprouting* axonal de las MTN's y la estabilización de contactos sinápticos con el músculo (Gurney et al., 1992; Helgren et al., 1994; Kwon y Gurney, 1994). También estimula la actividad colinérgica de las células ganglionares de la retina (Hofmann, 1988a, 1988b) y la diferenciación de células gliales progenitoras en astrocitos de tipo 2 (Hughes et al., 1988; Lillien et al., 1988; Lillien y Raff, 1990) y oligodendrocitos (Barres et al., 1992, 1993, 1994; Louis et al., 1993b; Mayer et al., 1994). Por último, el CNTF actúa induciendo distintos parámetros de diferenciación en diversas líneas celulares de estirpe neuronal (Ip et al., 1992b; Gupta et al., 1993; Symes et al., 1993; Lawrance et al., 1995).

Aunque se han caracterizado una gran variedad de acciones del CNTF *in vitro* e *in vivo*, nuestro conocimiento sobre las funciones fisiopatológicas de este factor es aún limitado. A pesar del amplio espectro de tipos neuronales sobre los que el CNTF es capaz de ejercer acciones biológicas, no parece que este factor pueda ser considerado como un verdadero factor neurotrófico. El CNTF está presente en una gran variedad de tejidos periféricos y a unas concentraciones que no parecen limitantes de la densidad de inervación, ya que son significativamente superiores a las de las NT's en los tejidos que lo producen (Barde, 1988, 1989; Ohta et al., 1995). También se ha observado la presencia de ARNm para CNTF en el SNC, incluido el área del hipocampo (Stöckli et al., 1989, 1991; Ip et al., 1991; Ohta et al., 1995). Los lugares de producción del CNTF tampoco se correlacionan con las zonas de inervación de las neuronas que responden a este factor (Barbin et al., 1984; Manthorpe et al., 1986a; Arakawa et al., 1990). Su expresión se inicia sólo postnatalmente (Stöckli et al., 1989, 1991), por lo que lógicamente no coincide con el período de muerte fisiológica de las

neuronas sensibles al CNTF. Por último, el CNTF es una proteína citosólica que carece de las secuencias consenso necesarias para su secreción al medio extracelular (Lin et al., 1989; Stöckli et al., 1989).

A la vista de todas estas observaciones, no resulta sorprendente que en animales portadores de una delección total del gen del CNTF el desarrollo del SN es aparentemente normal, detectándose únicamente una gradual pérdida de MTN's en la edad adulta (Masu et al., 1993). De hecho, se ha comprobado cómo un 2,3% de la población japonesa son mutantes homocigotos para CNTF, sin que dicha condición suponga una mayor incidencia de patologías neurológicas o de otros tipos (Takahashi et al., 1994).

2.3.2 El factor de diferenciación colinérgica

El factor de diferenciación colinérgica (CDF) fue inicialmente caracterizado por sus efectos sobre las neuronas simpáticas (Patterson y Chun, 1977; Fukuda, 1985; Yamamori et al., 1989; Bamber et al., 1994). Al ser purificado (Fukuda, 1985) y clonado (Yamamori et al., 1989), se comprobó que el CDF es una proteína secretora con una secuencia aminoacídica idéntica a la del LIF, un factor previamente conocido por su capacidad de inhibir la proliferación de células mieloides leucémicas.

El CDF/LIF estimula la generación de neuronas sensoriales a partir de células de la cresta neural y, durante el desarrollo embrionario tardío, favorece la supervivencia de neuronas sensoriales de los ganglios espinales (Murphy et al., 1991, 1993; Hendry et al., 1992) y del ganglio nodoso (Thaler et al., 1994). También favorece la supervivencia (Kotzbauer et al., 1994) y la diferenciación (Saadat et al., 1989; Rao y Landis, 1990; Nawa et al., 1991; Sun et al., 1994) de las neuronas simpáticas, rescata las MTN's espinales de la muerte inducida por axotomía (Cheema et al., 1994) y estimula la supervivencia de las MTN's

embrionarias *in vitro* (Martinou et al., 1992). De hecho, en el tejido muscular esquelético embrionario es posible detectar ARNm para CDF/LIF (Patterson y Fann, 1992). También se ha demostrado que el CDF/LIF puede ser transportado retrógradamente por las neuronas simpáticas (Ure y Campenot, 1994), motoras y sensoriales (Hendry et al., 1992; Curtis et al., 1994). El CDF/LIF también estimula el crecimiento, la maduración y la supervivencia de oligodendrocitos *in vitro* (Mayer et al., 1994). Paradójicamente, se ha descrito que durante el desarrollo embrionario el CDF/LIF es capaz de inducir la muerte apoptótica de una subpoblación de neuronas simpáticas (Nawa et al., 1990; Kessler et al., 1993; Kotzbauer et al., 1994).

Aunque sólo existe un 30% de similitud entre las secuencias aminoacídicas del CNTF y del CDF/LIF (Bazan, 1991), los efectos biológicos de estos dos factores neurotróficos sobre las células neuronales se solapan en gran medida tanto *in vitro* como *in vivo* (Adler et al., 1979a; Lillien et al., 1988; Lin et al., 1989; Saadat et al., 1989; Stöckli et al., 1989; Yamamori et al., 1989; Rao et al., 1990; Sendtner et al., 1990; Murphy et al., 1991, 1993; Hall y Rao, 1992; Martinou et al., 1992; Bamber et al., 1994; Cheema et al., 1994). Esta correspondencia hizo suponer que ambos factores actúan a través de mecanismos similares, como posteriormente se ha comprobado al elucidar la estructura de sus respectivos receptores (revisado en Capítulo 3).

2.3.3 *Otros factores con actividad neurotrófica*

Existe una larga lista de factores de crecimiento con actividades diferentes sobre los distintos tipos celulares existentes en los vertebrados. Aunque el término factor de crecimiento sugiere proliferación celular, muchos de estos factores tienen otras funciones, como la activación de la diferenciación celular. Algunos factores de crecimiento han mostrado su

capacidad para promover en neuronas la supervivencia y la diferenciación neuronal. Sin embargo, sus estructuras moleculares, el tipo de receptores, la ausencia de señales para ser segregados, su presencia en elevadas cantidades en una gran diversidad de tejidos y, sobre todo, el hecho de no ser sintetizados por el tejido neuronal, hace que deban ser incluidos en un grupo distinto y diferenciado con respecto a los factores neurotróficos anteriormente descritos. Dentro de este grupo (revisado por: López-Lozano y Moreno, 1996) destacan los FGF's, el EGF, los factores de crecimiento insulinoideos (IGF's), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los TGF's o las interleukinas.

Especial atención merece la familia del FGF. En general, los FGF's son proteínas de 16 kDa que actúan como mitógenos sobre una gran variedad de tipos celulares (Gospodarowicz et al., 1986). Clásicamente se conocen dos subtipos de FGF, el ácido (FGFa o tipo I) y el básico (FGFb o tipo II), aislados a partir de la glándula pituitaria y del cerebro respectivamente. Presentan un 55% de homología en su secuencia primaria pero, como su nombre indica, difieren en los pl's (Esch et al., 1985; Giménez-Gallego, 1985). Además del FGFa y del FGFb, en los últimos años se han identificado hasta un total de nueve miembros de la familia del FGF. La mayoría de ellos son segregados de forma constitutiva, se unen a proteoglicanos de la matriz extracelular y de las superficies celulares, y señalizan a través de cuatro receptores tirosina kinasa transmembranarios (receptores para FGF; revisados por: Mason, 1994).

El FGFa y el FGFb tienen la capacidad de aumentar la supervivencia de neuronas embrionarias *in vitro*, entre las que se encuentran las neuronas del hipocampo, del córtex cerebral, del cuerpo estriado, del *septum*, del cerebelo, de los ganglios ciliares y de la médula espinal. Asimismo, el FGF induce el crecimiento neurítico de las células PC12, de las células cromafines y de las células ganglionares de la retina

(revisado por: Barde, 1989). *In vitro*, el FGFb tiene efectos neurotróficos sobre las MTN's (Arakawa et al., 1990), habiéndose demostrado la presencia de su ARNm en el tejido muscular esquelético (McManaman et al., 1989) y en mioblastos (Gospodarowicz y Ferrara, 1988).

El FGF-5 es uno de los últimos miembros descritos de la familia del FGF (Zhan et al., 1987, 1988). Se trata de una proteína de 268 aminoácidos que, a diferencia del FGFa y del FGFb, tiene una secuencia secretora (Zhan et al., 1988; Hébert et al., 1990), siendo posible su liberación al medio extracelular (Bates et al., 1991). Se expresa en el tejido muscular embrionario y adulto de las ratas (Hughes et al., 1993a) y es capaz de rescatar las MTN's espinales en cultivo de la muerte por privación neurotrófica (Hughes et al., 1993a, 1993b).

2.4 Los factores neurotróficos pueden favorecer la muerte neuronal

Con gran sorpresa inicial, en contra de cualquier dogma asumido sobre el neurotrofismo hasta hace muy poco tiempo, se ha descrito cómo en determinadas circunstancias las NT's pueden inducir la muerte de células neuronales. Tal es el caso del BDNF, de la NT-3 y de la NT-4/5, que pueden potenciar la muerte necrótica de células neuronales (Koh et al., 1995). Otro ejemplo lo constituye la capacidad del NGF para estimular la muerte de las neuronas del núcleo istmo-óptico del embrión de pollo (von Bartheld et al., 1994). Asimismo, la administración exógena de NGF en animales neonatales en los que se ha practicado la axotomía de un tronco nervioso periférico, comporta un incremento en el número de MTN's que mueren (Miyata et al., 1986), aunque en este caso concreto no está claro si el NGF actúa sobre las MTN's de forma directa o indirecta. El CDF/LIF y el CNTF también son capaces de inducir la muerte

apoptótica de una subpoblación de neuronas simpáticas (Nawa et al., 1990; Kessler et al., 1993; Kotzbauer et al., 1994). Curiosamente, dicha muerte neuronal puede ser evitada por el NGF (Kessler et al., 1993). Por otra parte, se ha descrito recientemente que la NT-3 inhibe el crecimiento axonal de las neuronas de los ganglios espinales en estadios precoces del desarrollo embrionario *in vivo* (Zhang et al., 1994a).

Por consiguiente, resulta evidente que, según las circunstancias, un mismo factor neurotrófico puede favorecer la muerte o la supervivencia neuronal. De esta manera, por ejemplo, sería posible eliminar aquellas neuronas que migran de forma errante o equivocadamente hacia las dianas incorrectas y que de otra guisa sobrevivirían al encontrar un aporte trófico suficiente. El número celular final podría en última instancia reflejar un equilibrio entre factores que estimulan contra aquéllos que evitan la muerte celular.

2.5 Las motoneuronas y los factores neurotróficos

Desde que se identificó el NGF, se ha buscado con gran intensidad un factor neurotrófico equivalente para las MTN's. En un principio se utilizaron cultivos de disociados medulares, enriquecidos en MTN's o de MTN's purificadas, demostrándose que las MTN's embrionarias son incapaces de sobrevivir y diferenciarse si no cuentan con la presencia de una actividad trófica soluble derivada del músculo (Giller et al., 1977; Bennett et al., 1980; Henderson et al., 1981; Schnaar y Schaffner, 1981; Hsu et al., 1982; Manthorpe et al., 1982; Slack y Pockett, 1982; Eagleson y Bennett, 1983, 1986; Smith y Appel, 1983; Tanaka, 1983; Tanaka y Obata, 1983; Calof y Reichardt, 1984; Nurcombe et al., 1984; Flanigan et al., 1985; Kaufman et al., 1985; Smith et al., 1985, 1986; Dohrmann et al., 1986; O'Brien y Fischbach, 1986; McManaman et al., 1988a, 1988b;

Martinou et al., 1989; Arakawa et al., 1990; Rogers et al., 1990; Bloch-Gallego et al., 1991; Jeong et al., 1991; Juurlink et al., 1991a).

En buena coherencia con las observaciones *in vitro*, los extractos de músculo embrionario parcialmente purificados son capaces de reducir de forma específica el proceso de muerte fisiológica de las MTN's espinales *in vivo* (Oppenheim et al., 1988; McManaman et al., 1990) así como la pérdida de MTN's inducida por la ablación de las extremidades (Oppenheim y Haverkamp, 1988; Oppenheim et al., 1988). Asimismo, Kashihara et al. (1993) han identificado especies de ARNm en las células musculares del embrión de pollo que codifican proteínas capaces de reducir de forma significativa la magnitud de la muerte natural de MTN's, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Sin embargo, las estrategias clásicas de fraccionamiento bioquímico que permitieron aislar el NGF, el BDNF o el CNTF, han resultado infructuosas en el caso del supuesto factor neurotrófico de las MTN's. Smith et al. (1985) pudieron separar una proteína con un peso molecular aparente de 35 kDa, capaz de estimular el crecimiento neurítico de las MTN's. Posteriormente, se demostró la presencia en extractos de músculo esquelético de una actividad proteica neurotrófica que podría incentivar la supervivencia de las MTN's *in vivo*, con un peso molecular de <30 kDa, diferente de otros factores neurotróficos conocidos, y que está regulada durante el desarrollo embrionario (Oppenheim y Haverkamp, 1988; Oppenheim et al., 1988). Dohrmann et al. (1986) ha obtenido *in vitro* resultados similares a los descritos *in vivo* por Oppenheim et al. (1988).

Otro de los factores purificados a homogeneidad que ha sido parcialmente caracterizado es el factor de desarrollo colinérgico (ChDF; *choline acetyltransferase development factor*) (McManaman et al., 1988a,

1990). Esta molécula es diferente del CDF/LIF. Se trata de una proteína ácida con un peso molecular de 20 kDa, que estimula la actividad colina acetiltransferasa en las neuronas de la médula espinal (McManaman et al., 1988a, 1990) y permite rescatar hasta un 30% de las MTN's espinales que normalmente mueren durante el período de muerte neuronal fisiológica (McManaman et al., 1990).

Una estrategia más productiva ha sido la de comprobar la influencia de moléculas con actividad neurotrófica conocida sobre las MTN's. A lo largo de los años se ha identificado una gran variedad de moléculas tróficas que influyen sobre la supervivencia y diferenciación de las MTN's. Curiosamente, la gran mayoría de moléculas identificadas con actividad neurotrófica sobre las MTN's tienen pesos moleculares en el rango 10-30 kDa, de acuerdo con los resultados obtenidos mediante estrategias más clásicas. Entre éstas, se encuentran el NGF, el BDNF, la NT-3, la NT-4/5, el GDNF, el CNTF, el CDF/LIF, diversas formas de FGF, la insulina y los IGF-I y -II, los PDGF- α y - β , la interleukina 6 (IL-6), el TGF β y la cardiotrofina-1 (CT-1) (revisado por: Oppenheim et al., 1993; Houenou et al., 1994; Tabla 2.1).

Sin embargo, la mayoría de estos agentes neurotróficos no son suficientes *per se* para neutralizar totalmente la muerte fisiológica de las MTN's durante el desarrollo embrionario, no igualando ninguno la eficacia del extracto muscular (Oppenheim et al., 1993). Por otra parte, existen múltiples discrepancias entre la infinidad de estudios realizados, aparentemente en función de si los resultados han sido obtenidos *in vitro* o *in vivo*, así como de los diferentes grupos investigadores. En conjunto, estos hechos sugieren que las MTN's probablemente no dependen de un sólo agente neurotrófico, sino de un "ambiente" neurotrófico resultante del solapamiento de las acciones de diferentes factores.

TRATAMIENTO (μg diarios)	MOTONEURONAS (N)
Control	11.977 \pm 108 (108)
NGF (5 μg)	12.108 \pm 285 (15)
BDNF (5 μg)	15.221 \pm 238 (20) ^c
NT-3 (5 μg)	12.674 \pm 340 (10)
NT-4/5 (5 μg)	13.800 \pm 481 (10) ^a
PDGF- $\alpha\beta$ (5 μg)	14.025 \pm 301 (8) ^b
TGF β (5 μg)	13.554 \pm 343 (7) ^a
EGF (1-3 μg)	12.429 \pm 305 (10)
IGF-I (5 μg)	15.106 \pm 234 (9) ^c
IGF-II (5 μg)	14.166 \pm 471 (6) ^b
IL-6 (5 μg)	14.760 \pm 350 (6) ^d
CDF/LIF (5 μg)	13.645 \pm 474 (8) ^a
CNTF (10 μg)	16.718 \pm 331 (16) ^d
S-100b (15 μg)	15.919 \pm 163 (12) ^d
FGFb (5 μg)	12.095 \pm 464 (5)
FGFa (5 μg)	12.175 \pm 355 (6)

N = tamaño de la muestra

a) $p < 0,05$ b) $p < 0,01$ c) $p < 0,003$

d) $p < 0,0001$ vs. control, *t*-test.

Tabla 2.1. Números de MTN's (media \pm SEM) en la médula espinal lumbar de embriones de pollo E10 tratados diariamente desde E6 a E9 con varios factores de crecimiento o agentes neurotróficos (adaptado de: Oppenheim et al., 1993).

2.5.1 *El NGF*

Durante muchos años se ha descartado la posibilidad de que el NGF participe en el control de la supervivencia de las MTN's. Aunque las MTN's embrionarias expresan en su superficie los receptores de baja afinidad y, en cantidades muy inferiores, de alta afinidad para el NGF (Yan y Johnson, 1988; Yan et al., 1988; Heuer et al., 1990a; Henderson et al., 1993a) y son capaces de transportar retrógradamente el NGF (Yan et al., 1988, 1993; Homma et al., 1993), esta NT es aparentemente incapaz de bloquear la muerte de las MTN's durante el desarrollo embrionario tanto *in vivo* (Yan et al., 1988) como *in vitro* (Arakawa et al., 1990; Bloch-Gallego et al., 1991; Henderson et al., 1993a; Hughes et al., 1993b; Becker et al., 1997), ni tampoco la muerte inducida por axotomía (Yan et al., 1988, 1992; Sendtner et al., 1992a; Koliatsos et al., 1993).

Sin embargo, trabajos más recientes han contradicho esta idea clásica, al demostrarse que el NGF puede rescatar MTN's de la muerte inducida por la desafrenciación central en el embrión de pollo (Oppenheim et al., 1992a; Qin-Wei et al., 1994; Yin et al., 1994b). Asimismo, en el pollo y el ratón -aunque no en la rata- se ha comprobado cómo el NGF puede neutralizar parcialmente la muerte de MTN's inducida por axotomía (Yan et al., 1993; Houenou et al., 1994; Li et al., 1994). Por contra, también hay evidencia experimental de que el NGF puede estimular incluso la degeneración de MTN's e interferir con la acción promotora de la supervivencia de las MTN's de otros miembros de la familia de las NT's *in vitro* e *in vivo* (Miyata et al., 1986; Sendtner et al., 1992a; Hughes et al., 1993b), probablemente en relación con mecanismos de competición por la unión de los ligandos a sus receptores.

2.5.2 *El BDNF*

El BDNF es capaz de mantener vivas las MTN's embrionarias en cultivo (Bloch-Gallego et al., 1991; Henderson et al., 1993a; Becker et al., 1997) e *in vivo* durante el período de muerte neuronal fisiológica así como en relación con la desafrenciación central (Oppenheim et al., 1992a). También rescata un número substancial de MTN's espinales, corticoespinales y craneales tras la lesión de los correspondientes troncos nerviosos (Sendtner et al., 1992a; Yan et al., 1992, 1993; Koliatsos et al., 1993; Novikov et al., 1995; Vejsada et al., 1995; Giehl y Tetzlaff, 1996) en las edades postnatales.

Por otra parte, se ha demostrado la expresión de ARNm para BDNF en el tejido muscular esquelético durante el período de muerte fisiológica de las MTN's espinales (Henderson et al., 1993a; McKay et al., 1993) así como en edades adultas (Koliatsos et al., 1993). La

denervación comporta un incremento en la expresión de BDNF en el tejido muscular esquelético (Koliatsos et al., 1993), en coherencia con el aumento de la eficacia trófica de los extractos de músculo denervado sobre las MTN's espinales (Ebendal et al., 1980; Slack y Pockett, 1982; Henderson et al., 1983; Nurcombe et al., 1984; Hill y Bennett, 1986; Charnet-Gouin et al., 1991; Houenou et al., 1991; Rassendren et al., 1992). Las MTN's neonatales y adultas son capaces de transportar retrógradamente el BDNF (DiStefano et al., 1992; Yan et al., 1992, 1993; Koliatsos et al., 1993; Clatterbuck et al., 1994). Por último, estas neuronas expresan ARNm para TrkB -receptor de alta afinidad para el BDNF-, tanto en la edad neonatal como durante el período de muerte fisiológica de las MTN's espinales (Ernfors et al., 1993; Henderson et al., 1993a; Yan et al., 1993).

2.5.3 La NT-3

La NT-3 estimula la supervivencia de las MTN's embrionarias *in vitro* (Henderson et al., 1993a; Hughes et al., 1993b) y también es capaz de neutralizar la muerte de MTN's espinales, corticoespinales y craneales inducida por la axotomía en animales neonatos y adultos, aunque su efecto es menos potente que el del BDNF (Yan et al., 1993; Vejsada et al., 1995; Giehl y Tetzlaff, 1996). Se ha demostrado la presencia de ARNm para NT-3 en el tejido muscular esquelético durante el período de muerte neuronal fisiológica (Schecterson y Bothwell, 1992; Henderson et al., 1993a) así como la capacidad de las MTN's neonatales y adultas para transportar retrógradamente la NT-3 (Wayne y Heaton, 1988; Yan et al., 1988, 1991, 1992, 1993; DiStefano et al., 1992; Koliatsos et al., 1993). Asimismo, las MTN's expresan ARNm para trkC -receptor de alta afinidad para la NT-3-, tanto en la edad neonatal como durante el desarrollo embrionario, incluyendo el período de muerte fisiológica de las MTN's espinales (Ernfors et al., 1993; Henderson et al., 1993a; Yan et al., 1993).

La NT-3 también está aparentemente implicada en la regulación de la diferenciación de las MTN's a partir de células progenitoras del tubo neural de las aves (Averbuch-Heller et al., 1994). De acuerdo con esta observación, es posible detectar ARNm para TrkC en el tubo neural en etapas muy precoces del desarrollo embrionario (Averbuch-Heller et al., 1994).

2.5.4 La NT-4/5

La NT-4/5 tiene un efecto estimulador de la supervivencia de MTN's embrionarias *in vitro* durante el desarrollo embrionario (Henderson et al., 1993a) así como de las MTN's espinales y craneales lesionadas *in vivo*, aunque transitorio (Hughes et al., 1993b; Koliatsos et al., 1994; Schmalbruch y Rosenthal, 1995; Vejsada et al., 1995). La NT-4/5 también induce el *sprouting* de las MTN's (Funakoshi et al., 1995). Sin embargo, existen estudios contradictorios en referencia a la expresión y síntesis de la NT-4/5 en el tejido muscular. Henderson et al. (1993a) inicialmente documentaron la ausencia de síntesis de la NT-4/5 en el músculo durante el desarrollo embrionario, mientras que Funakoshi et al. (1995) han demostrado posteriormente la presencia de ARNm para NT-4/5 en el tejido muscular embrionario.

2.5.5 El GDNF

Recientemente han aparecido diversos trabajos (Henderson et al., 1994; Mitsumoto et al., 1994a; Zurn et al., 1994; Li et al., 1995b; Oppenheim et al., 1995; Yan et al., 1995; Zurn et al., 1994, 1996; Houenou et al., 1996; Sagot et al., 1996) que indican que el GDNF tiene importantes efectos neurotróficos *in vivo* e *in vitro* sobre las MTN's espinales, tanto durante el desarrollo embrionario como en la edad adulta. De hecho, el GDNF puede ser considerado como el factor neurotrófico

para MTN's más potente de entre los identificados hasta la fecha, siendo su efecto estimulador de la supervivencia de MTN's *in vitro* aproximadamente 75 veces más efectivo que la más activa de las NT's, el BDNF (Henderson et al., 1994). *In vivo*, es capaz de neutralizar el proceso de muerte fisiológica de las MTN's espinales (Oppenheim et al., 1995). Sin embargo, evidencias recientes sugieren que el GDNF actúa sólo sobre el mantenimiento del soma de las MTN's y, por tanto, sobre su supervivencia, no siendo capaz de evitar la degeneración axonal de las MTN's (Houenou et al., 1996; Sagot et al., 1996). Esto resulta sorprendente ya que el GDNF puede estimular el crecimiento neurítico de otros tipos neuronales, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ebendal et al., 1995; Hudson et al., 1995; Trupp et al., 1995; Zurn et al., 1996).

En congruencia con la implicación del GDNF como factor neurotrófico derivado de tejido diana para las MTN's, se ha demostrado que el GDNF se une a receptores específicos y a continuación es internalizado y transportado de forma retrógrada por las MTN's espinales de ratas neonatales (Yan et al., 1995). Asimismo, se ha comprobado la presencia de ARNm para GDNF en el tejido muscular, tanto en los esbozos de las extremidades de los embriones de rata como en cultivos de miotubos embrionarios neonatales (Henderson et al., 1994), así como en la médula espinal (Schaar et al., 1993; Strömberg et al., 1993; Poulsen et al., 1994; Springer et al., 1994; Choi-Lundberg y Bohn, 1995; Trupp et al., 1995). Las células de Schwann en la periferia (Henderson et al., 1994) y los astrocitos tipo 1 en el SNC (Schaar et al., 1993) también sintetizan ARNm para GDNF.

2.5.6 *El CNTF*

In vitro, el CNTF tiene potentes efectos sobre la supervivencia, el crecimiento neurítico y la actividad colinérgica de las MTN's embrionarias

y adultas (Arakawa et al., 1990; Magal et al., 1991; Wong et al., 1993; Kato y Lindsay, 1994). La administración exógena de CNTF permite rescatar las MTN's espinales destinadas a morir durante el período de muerte fisiológica en el embrión de pollo (Oppenheim et al., 1991). *In vivo*, se ha demostrado la presencia de la subunidad α del receptor del CNTF en la superficie de las MTN's maduras (Ip et al., 1993b), así como la capacidad de estas neuronas para transportar el CNTF de forma retrógrada (Curtis et al., 1993). Sin embargo, el CNTF no es probablemente responsable de la regulación fisiológica de la supervivencia de las MTN's durante el desarrollo embrionario, dado que es una proteína citosólica (Lin et al., 1989; Stöckli et al., 1989). Tampoco es posible detectar ARNm para CNTF en el tejido muscular durante el período de muerte fisiológica de las MTN's (Stöckli et al., 1989, 1991).

El nervio periférico adulto es la fuente más abundante de CNTF (Lin et al., 1989; Stöckli et al., 1989), localizándose principalmente en las células de Schwann (Dobrea et al., 1992; Friedman et al., 1992; Rende et al., 1992a; Sendtner et al., 1992c). Tras la lesión de los troncos nerviosos motores periféricos, disminuye la expresión de este factor trófico (Friedman et al., 1992; Rende et al., 1992; Sendtner et al., 1992c), aunque su transporte retrógrado aumenta considerablemente (Curtis et al., 1993; Clatterbuck et al., 1994). Este hecho, junto con su aparición tardía durante el desarrollo, ha propiciado que el CNTF sea considerado un factor de lesión (revisado en Apartado 4.2). De hecho, el CNTF rescata MTN's faciales y espinales neonatales de la muerte inducida por axotomía (Sendtner et al., 1990; Li et al., 1994) y su administración sistémica mejora los déficits funcionales y los cambios citopatológicos en modelos animales de disfunción neuromuscular (Helgren et al., 1992; Sendtner et al., 1992b). En cambio, los animales transgénicos portadores de una delección para el gen del CNTF prácticamente presentan sólo una leve disfunción neuromuscular en los estadios tardíos de la vida del

animal (Masu et al., 1993; Takahashi et al., 1994), quizás en relación con la implicación del CNTF en la regulación de los fenómenos de *sprouting* y estabilización de los contactos sinápticos de las MTN's con el músculo diana (Gurney et al., 1992; Helgren et al., 1992; Kwon y Gurney, 1994).

2.5.7 *El CDF/LIF*

El CDF/LIF es otro agente neurotrófico con capacidad para promover la supervivencia de MTN's de rata *in vitro* (Martinou et al., 1992). Su acción neuroprotectora sobre las MTN's espinales y craneales neonatales y adultas lesionadas es menos potente que la de las NT's BDNF, NT-3 y NT-4/5 (Hughes et al., 1993b; Li et al., 1994; Ikeda et al., 1995a; Vejsada et al., 1995; Sendtner et al., 1996). En congruencia con esta acción, cuando se produce la lesión de un nervio periférico sobreviene un incremento del transporte retrógrado del CDF/LIF a nivel de las MTN's lesionadas así como un aumento de su expresión en el segmento distal del nervio seccionado (Curtis et al., 1994).

2.5.8 *Los FGF's*

Las isoformas FGFa y, en especial, FGFb estimulan la supervivencia de MTN's espinales embrionarias *in vitro* (Arakawa et al., 1990; Henderson et al., 1993a; Hughes et al., 1993b) así como su diferenciación colinérgica *in vivo* (McManaman et al., 1989). Ambas isoformas de FGF están presentes en el tejido muscular esquelético embrionario (Joseph-Silverstein et al., 1989; McManaman et al., 1989; Vaca et al., 1989; Alterio et al., 1990; González et al., 1990; Morrow et al., 1990; Fu et al., 1991) y adulto (Vaca et al., 1989). Asimismo, las MTN's espinales expresan receptores para FGF (Wanaka et al., 1990). Sin embargo, ni el FGFa ni el FGFb son capaces de rescatar las MTN's del proceso de muerte fisiológica *in vivo* (McManaman et al., 1989; Nurcombe

et al., 1991; Oppenheim et al., 1992b, 1992c; Li et al., 1994) ni de evitar la pérdida de MTN's craneales que se produce tras la lesión del nervio facial (Hughes et al., 1993b).

Por otra parte, el FGFa y el FGFb son moléculas citosólicas (Abraham et al., 1986) y aparentemente precisan formar un complejo con un proteoglicano heparán-sulfato específico para ejercer su acción neurotrófica sobre las MTN's a través de los correspondientes receptores para FGF (Nurcombe et al., 1993). La expresión tejido-específica de dichos proteoglicanos podría ser responsable de los efectos positivos de promoción de supervivencia del FGFb sobre las MTN's hipoglosas lesionadas *in vivo* (Grothe y Unsicker, 1992), que están en desacuerdo con los otros efectos negativos *in vivo* de las isoformas FGFa y FGFb anteriormente descritos (McManaman et al., 1989; Nurcombe et al., 1991; Oppenheim et al., 1992b, 1992c; Hughes et al., 1993b; Li et al., 1994).

En conjunto, todos estos hechos hacen improbable la participación de dichas isoformas de FGF en la regulación del proceso de muerte fisiológica de las MTN's, aunque se ha sugerido su posible actuación en la modulación de la síntesis o degradación de la matriz extracelular.

A diferencia de las isoformas FGFa y FGFb, el FGF-5 sí ha sido implicado como agente neurotrófico para las MTN's espinales. Es capaz de mantener estas células neuronales vivas en cultivo (Hughes et al., 1993a, 1993b) y su ARNm está presente en el músculo esquelético durante el período de muerte fisiológica de las MTN's en el desarrollo embrionario así como posteriormente en la edad adulta (Hughes et al., 1993a). El FGF-5 cuenta con la secuencia consenso necesaria para ser secretada (Zhan et al., 1988; Bates et al., 1991), pudiéndose detectar su presencia en extractos musculares mediante técnicas de inmunoprecipitación (Hughes et al., 1993a).

No obstante, en las ratas adultas la mayor parte del FGF-5 presente en los extractos musculares está unida a la matriz extracelular (Hughes et al., 1993a), presumiblemente a través de la interacción con componentes del tipo heparán-sulfato (Zhan et al., 1988). Este hecho sugiere que, como ocurre con las isoformas FGFa y FGFb, la actividad del FGF-5 sobre las MTN's espinales en la edad adulta probablemente depende de la expresión tejido-específica de proteoglicanos heparán-sulfato. Esta hipótesis explicaría la aparente incapacidad del FGF-5 para reducir la pérdida de MTN's faciales inducida por axotomía en ratas neonatales (Hughes et al., 1993b).

2.5.9 Los IGF-I y -II

Los IGF-I y -II estimulan la supervivencia de las MTN's durante el proceso de muerte fisiológica, tanto *in vitro* (Arakawa et al., 1990; Hughes et al., 1993b) como *in vivo* (Neff et al., 1993). También son eficaces en la prevención de la muerte de MTN's inducida mediante axotomía en embriones de pollo (Neff et al., 1993) y en ratones neonatales (Sendtner et al., 1990, 1992a; Hughes et al., 1993b; Li et al., 1994), así como en la inducción del fenómeno de *sprouting* a nivel de nervios intramusculares adultos (Caroni y Grandes, 1990). Los IGF-I y -II se expresan en el tejido muscular esquelético embrionario y adulto, aumentando sus niveles de forma significativa tras la denervación y la parálisis muscular (Ishii, 1989; Tollefsen et al., 1989; Bondy et al., 1990; Ralphs et al., 1990; Caroni y Becker, 1992; Streck et al., 1992). A pesar de todas estas evidencias, los IGF-I y -II no pueden ser considerados moléculas neurotróficas de relevancia fisiológica durante el desarrollo embrionario ni, quizás tampoco, en la edad adulta.

2.5.10 Los PDGF- α y - β y la interleukina 6

Tanto las distintas isoformas del PDGF como la IL-6 rescatan MTN's embrionarias de pollo del proceso de muerte programada (Oppenheim et al., 1993), aunque son ineficaces en la prevención de la muerte o atrofia de MTN's tras la axotomía en el ratón (Li et al., 1994).

2.5.11 El TGF β

Se ha descrito que, a concentraciones subnanomolares, el TGF β incrementa la supervivencia de las MTN's embrionarias *in vitro* (Martinou et al., 1990). Esta acción trófica del TGF β sobre las MTN's espinales es potenciada de forma sinérgica por el FGFb (Gouin et al., 1996). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que las MTN's no sean una diana directa del TGF β , dado que la acción neurotrófica del TGF β ha sido documentada en cultivos de MTN's espinales sobre una capa de astrocitos (Martinou et al., 1990). De hecho, es de sobras conocida la actividad neurotrófica de los astrocitos sobre las MTN's en cultivo (Eagleson et al., 1985).

2.5.12 La cardiotrofina 1

La última molécula incluida en la lista de posibles factores de supervivencia de las MTN's es la CT-1 (Pennica et al., 1996a). Se trata de una proteína recientemente identificada (Pennica et al., 1995a) que, como el CNTF o el CDF/LIF, pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento de las citocinas. La CT-1 induce la hipertrofia y estimula la supervivencia de los miocitos cardiacos en cultivo, favorece la supervivencia *in vitro* de las neuronas dopaminérgicas y las neuronas del ganglio ciliar e induce la modificación del fenotipo de las neuronas simpáticas (Pennica et al., 1995b; Sheng et al., 1996). Asimismo, se ha

demostrado su presencia en el tejido muscular esquelético y su efecto estimulador de la supervivencia de las MTN's embrionarias en cultivo (Pennica et al., 1996a).

La CT-1 reúne algunos de los criterios requeridos para ser considerada como un agente neurotrófico derivado de diana. Es posible detectarla en el tejido muscular esquelético embrionario durante el período de muerte fisiológica de las MTN's espinales (Pennica et al., 1996a; Sheng et al., 1996). También se ha demostrado su presencia en el tejido muscular adulto (Pennica et al., 1995a, 1996b). La CT-1 es secretada por los miotubos en cultivo (Pennica et al., 1996a) y, por último, es capaz de mantener la supervivencia de las MTN's espinales *in vitro*, así como tras la axotomía (Pennica et al., 1996a). Curiosamente, la CT-1 puede interactuar con subunidades comunes de los receptores para CDF/LIF y para CNTF (Pennica et al., 1995b, 1996a, 1996c).

3. LOS RECEPTORES DE LAS NEUROTROFINAS Y SUS MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL NEUROTRÓFICA

Las diferencias y semejanzas entre los miembros de la familia de las NT's también se reflejan en la especificidad de su interacción con receptores de la superficie celular de las neuronas. De esa forma, consiguen provocar individualmente los mismos efectos funcionales aunque en poblaciones neuronales distintas. Por la lógica de la historia, los primeros receptores de NT's caracterizados fueron los del NGF (Sutter et al., 1979a, 1979b). En concreto, mediante estudios de afinidad realizados en las diferentes clases de neuronas sensibles al NGF, se identificaron dos tipos de receptores, de alta y baja afinidad, caracterizados por las distintas constantes de disociación.

El receptor de baja afinidad tiene una constante de disociación elevada o "rápida" de $\sim 10^{-9}$ M, mientras que el receptor de alta afinidad cuenta con una constante de disociación baja o "lenta" de $\sim 10^{-11}$ M (Sutter et al., 1979a, 1979b; Landreth y Shooter, 1980; Massagué et al., 1981; Schechter y Bothwell, 1981; Godfrey y Shooter, 1986; Stach y Pérez-Polo, 1987). Aproximadamente el 10-15% de los sitios de unión son de alta afinidad, en tanto que el resto corresponde a sitios de unión de baja afinidad (Sutter et al., 1979a; Landreth y Shooter, 1980; Schechter y Bothwell, 1981). Posteriormente, se ha generalizado la existencia de estos dos tipos de unión a las restantes NT's, al comprobarse que las diferentes NT's son capaces de interaccionar con los mismos dos tipos básicos de receptores de membrana (Rodríguez-Tébar y Barde, 1988; Rodríguez-Tébar et al., 1989, 1990, 1992; Hallböök et al., 1991).

Aunque ambos receptores pueden interactuar con la correspondiente NT, desde hace mucho tiempo se tiene la noción de que la actividad biológica asociada con el factor depende principalmente de la activación del receptor de alta afinidad (Greene, 1977b; Sutter et al., 1979b; Sonnenfeld e Ishii, 1985; Green et al., 1986). A lo largo de los años se ha obtenido una gran cantidad de información sobre la naturaleza molecular de ambos tipos de receptores. A pesar de ello, no se ha conseguido esclarecer la naturaleza del receptor de alta afinidad, sobre la que persiste una dura y duradera polémica.

3.1 Las propiedades moleculares de los dos tipos de receptores de las neurotrofinas

3.1.1 El receptor de baja afinidad

Hasta hace relativamente poco tiempo en la literatura científica sólo se hablaba del receptor del NGF de baja afinidad (Johnson et al., 1986a; Radeke et al., 1987). Un hecho constatado desde hace muchos años para el que no se tenía una explicación clara, es que este receptor, además de estar presente en todas las neuronas que responden al NGF (Buck et al., 1987; Patil et al., 1990), también se encuentra en neuronas que no son sensibles a este agente neurotrófico (Yan y Johnson, 1988; Bothwell, 1990). Sin embargo, posteriormente se comprobó cómo el receptor del NGF de baja afinidad se une con la misma afinidad ($K_d \sim 10^{-9}$ M) al BDNF, la NT-3 y la NT-4/5 (Rodríguez-Tébar y Barde, 1988; Rodríguez-Tébar et al., 1989, 1990, 1992; Hallböök et al., 1991), por lo que se puede hablar de él como el único receptor de las NT's de baja afinidad.

El receptor de las NT's de baja afinidad fue históricamente el primero en ser caracterizado a nivel molecular. La identificación de su secuencia de aminoácidos y de su clonación (Chao et al., 1986; Johnson et al., 1986a; Radeke et al., 1987; Large et al., 1989; Heuer et al., 1990a), permitieron saber que se trata de una proteína transmembranaria de masa molecular relativa de 49 kDa con una pequeña región citoplasmática, que se glicosila a nivel de su dominio extracelular hasta convertirse en una proteína de ~75 kDa *in vitro* (p75) (Grob et al., 1985; Johnson et al., 1986a).

El receptor p75 pertenece a una familia de proteínas de superficie celular constituida, entre otros, por los dos receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), el antígeno Fas, los antígenos linfocitarios T OX40 y mu4-1BB, y los antígenos linfocitarios B CD30 y CD40 (Stamenkovic et al., 1989; Loetscher et al., 1990; Mallett et al., 1990; Schall et al., 1990; Smith et al., 1990; Itoh et al., 1991; Dürkop et al., 1992). Esta familia de moléculas presenta un grado importante de homología en el patrón de repeticiones ricas en cisteínas a nivel del extremo amino-terminal de su dominio extracelular que, en el caso de p75, determinan los diferentes sitios de unión a las NT's (Welcher et al., 1991). A nivel del dominio intracelular de p75, no se ha observado la presencia de ningún dominio de tipo serina/treonina o TK (Johnson et al., 1986a), aunque en la región carboxi-terminal de p75 se ha identificado un dominio que se corresponde con una secuencia aminoacídica consenso para la unión a proteínas G (Feinstein y Larhammer, 1990) así como otro dominio denominado "de muerte" (Boldin et al., 1995; Chapman, 1995), homólogo al que está presente en la porción citoplasmática del receptor del TNF α (Brakebusch et al., 1992; Itoh y Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993; Chapman, 1995).

3.1.2 *Los receptores de alta afinidad:*

3.1.2.1 El receptor TrkA

Desde la descripción inicial de la existencia del receptor de alta afinidad del NGF y, posteriormente, de las restantes NT's, se ha planteado una gran controversia sobre su naturaleza molecular, de forma que incluso hoy día aún no puede darse por resuelta. Un acontecimiento fundamental en la historia de la caracterización de los receptores de alta afinidad de las NT's ha sido la identificación de la familia de receptores Trk. Previamente a este hecho, se había determinado que el receptor de alta afinidad de NGF se autofosforilaba a nivel de tirosinas en relación con la estimulación neurotrófica (Meakin y Shooter, 1991a) y que contaba con un peso molecular de ~140-150 kDa (Massagué et al., 1981; Hosang y Shooter, 1985; Kaplan et al., 1991b).

El primero de la familia de receptores Trk en ser conocido, TrkA, fue inicialmente identificado como una proteína oncogénica fusionada con la tropomiosina no muscular en un carcinoma de colon humano (Martín-Zanca et al., 1986). El aislamiento y la caracterización molecular de este oncogén quimérico permitió la posterior identificación del alelo normal, el protooncogén *trkA* (Martín-Zanca et al., 1989). Este protooncogén codifica una proteína transmembranaria de 790 aminoácidos, con un péptido señal de 32 aminoácidos, un dominio de unión al ligando rico en sitios de *N*-glicosilación, un dominio transmembranario único, una región catalítica con dominio TK y una corta cola carboxi-terminal de 15 aminoácidos (Martín-Zanca et al., 1989).

El análisis bioquímico de células NIH3T3 expresas del protooncogén *trkA* indica que el principal producto traduccional de este gen es una glicoproteína de 110 kDa con un esqueleto polipeptídico de 80

kDa. La glicoproteína de 110 kDa se glicosila durante su transporte a la membrana plasmática, dando lugar a la forma madura de 140 kDa (Martín-Zanca et al., 1989). Si bien tanto gp110^{trkA} como gp140^{trkA} presentan actividad TK, sólo la forma de 140 kDa está presente en la superficie celular (Martín-Zanca et al., 1989).

La posterior comprobación de que la expresión del gen *trkA* se localiza en estructuras anatómicas del SN y en neuronas con capacidad de responder al NGF (Martín-Zanca et al., 1990; Kaplan et al., 1991b; Klein et al., 1991a), propició que se hipotetizara la implicación del protooncogén *trkA* en la mediación de los efectos biológicos del NGF. Esta hipótesis se confirmó al comprobarse que el NGF provoca la fosforilación a nivel de residuos de tirosina y estimula la actividad TK del receptor TrkA, siendo así identificado como un receptor para el NGF (Kaplan et al., 1991a, 1991b; Klein et al., 1991a).

Recientemente se han identificado las regiones del dominio extracelular de TrkA implicadas en la interacción con el NGF (Pérez et al., 1995; Urfer et al., 1995; MacDonald y Meakin, 1996). Adicionalmente, el receptor TrkA también es capaz de interactuar con la NT-3 y la NT-4/5 (Kaplan et al., 1991a, 1991b; Klein et al., 1991a, 1991b), aunque estudios de afinidad sugieren que TrkA utiliza diferentes sitios de unión para unirse al NGF y a la NT-3 (Cordon-Cardo et al., 1991).

Trabajos más recientes han permitido establecer que el protooncogén *trkA* codifica una segunda isoforma de 796 aminoácidos con actividad TK, que difiere de la primera por la presencia de 6 residuos aminoacídicos adicionales en el dominio extracelular (Barker et al., 1993; Horigome et al., 1993). Aunque no se han realizado estudios comparativos entre las dos isoformas, aparentemente tienen propiedades

biológicas similares (Klein et al., 1991a; Jing et al., 1992; Meakin et al., 1992).

3.1.2.2 El receptor TrkB

El segundo receptor de la familia Trk en ser identificado fue TrkB. Como TrkA, es una molécula de 145 kDa de peso molecular y 821 aminoácidos, altamente glicosilada y con todas las características propias de los receptores de superficie con actividad TK (Klein et al., 1989, 1990a, 1990b; Middlemas et al., 1991). La comparación de las secuencias de aminoácidos de TrkA y TrkB indica un elevado grado de homología, tanto en el dominio extracelular (57% homología, 38% identidad) como en la región catalítica TK (88% homología, 73% identidad). Además, ambas moléculas exhiben una cola carboxi-terminal de 15 aminoácidos (Klein et al., 1989, 1990a, 1990b; Middlemas et al., 1991).

TrkB constituye el receptor funcional para el BDNF y la NT-4/5, a pesar de que también es capaz de interactuar con la NT-3 (Berkemeier et al., 1991; Glass et al., 1991; Klein et al., 1991b; Squinto et al., 1991; Soppet et al., 1991; Dechant et al., 1993b). Las tres NT's provocan la fosforilación de TrkB a nivel de los residuos de tirosina presentes en su dominio intracitoplasmático y, secundariamente, inducen su actividad TK intrínseca (Berkemeier et al., 1991; Glass et al., 1991; Klein et al., 1991b; Soppet et al., 1991). Estudios de mutagénesis dirigida parecen indicar que el receptor TrkB cuenta con al menos dos sitios de unión diferentes en su dominio extracelular (Klein et al., 1992; Pérez et al., 1995; Urfer et al., 1995).

El *locus* del protooncogén *trkB* es grande y complejo con un complicado patrón transcripcional, habiéndose identificado un gran número de transcritos de diferentes tamaños (Klein et al., 1989, 1990b;

Middlemas et al., 1991; Dechant et al., 1993b; Strohmaier et al., 1996). Codifica al menos tres isoformas no catalíticas (Klein et al., 1990b; Middlemas et al., 1991; Dechant et al., 1993b; Vinh et al., 1994; Shelton et al., 1995), aunque hasta el momento sólo se ha documentado la expresión de la proteína gp95^{trkB} (Klein et al., 1990b). Se trata de una glicoproteína idéntica a gp145^{trkB} en los 465 primeros aminoácidos de la secuencia primaria, que comprenden el péptido señal, el dominio extracelular y la región transmembranaria. Sin embargo, gp95^{trkB} tiene un dominio citoplasmático muy corto de 23 aminoácidos, de los cuales los últimos 11 no son homólogos a ninguna de las secuencias presentes en gp145^{trkB} (Klein et al., 1990b). Se ha predicho la existencia de una segunda isoforma no catalítica con una secuencia casi idéntica a la de gp95^{trkB} (Middlemas et al., 1991).

3.1.2.3 El receptor TrkC

El protooncogén *trkC* es el tercer miembro de la familia génica de receptores Trk (Lamballe et al., 1991; Middlemas et al., 1991). El *locus trkC* codifica dos clases de receptores: catalíticas y truncadas. Hasta la fecha se han descrito varias isoformas catalíticas de TrkC (Lamballe et al., 1991, 1993; Tsoulfas et al., 1993; Valenzuela et al., 1993; Garner y Large, 1994; Shelton et al., 1995). La isoforma catalítica prototípica es un receptor TK de 825 aminoácidos (en el ratón y el cerdo) y un peso molecular de 145 kDa con todos los rasgos característicos de la familia de receptores Trk (Lamballe et al., 1991; Middlemas et al., 1991). El dominio extracelular de TrkC presenta con TrkA y TrkB una homología del 54 y 52% y una identidad del 35 y 39%, respectivamente. Los grados de homología son mucho mayores cuando se comparan los dominios catalíticos (86 y 90% de homología con TrkA y TrkB, respectivamente). TrkC también presenta un extremo corto carboxi-terminal de 15 aminoácidos, como los otros miembros de la familia Trk

(Lamballe et al., 1991; Middlemas et al., 1991). Las otras isoformas catalíticas de TrkC incorporan un número adicional y variable de residuos aminoacídicos a nivel del dominio intracitoplasmático (Lamballe et al., 1993; Tsoulfas et al., 1993; Valenzuela et al., 1993; Garner y Large, 1994; Shelton et al., 1995).

Por otra parte, las isoformas no catalíticas o truncadas de TrkC tienen una estructura similar a la de los receptores TrkB truncados, de forma que carecen del dominio TK. Hasta la fecha, se han descrito cuatro formas truncadas diferentes de TrkC, difiriendo en el número de residuos aminoacídicos citoplasmáticos (Tsoulfas et al., 1993; Valenzuela et al., 1993; Garner y Large, 1994; Shelton et al., 1995). TrkC parece ser el receptor preferido de la NT-3, no siendo capaz de unirse ni al BDNF ni al NGF (Lamballe et al., 1991). Aunque las respuestas biológicas a la NT-3 están mediadas por TrkC (Lamballe et al., 1991), datos obtenidos *in vitro* sugieren que las diferentes isoformas catalíticas de TrkC difieren en su capacidad para mediar la actividad de la NT-3 (Lamballe et al., 1993; Tsoulfas et al., 1993; Valenzuela et al., 1993; Garner y Large, 1994).

3.1.2.4 El receptor Dtrk

El receptor Dtrk es una proteína de 1.033 aminoácidos con un grado de homología con los otros genes *trk* del 42-48% a nivel del dominio extracelular, y del 60-63% en la región catalítica TK. Adicionalmente, Dtrk contiene varias características estructurales únicas, entre las que llama la atención una inserción de 60 aminoácidos en el dominio catalítico que constituye potencialmente un segundo sitio de unión al ATP (Barbacid et al., 1991; Pulido et al., 1992).

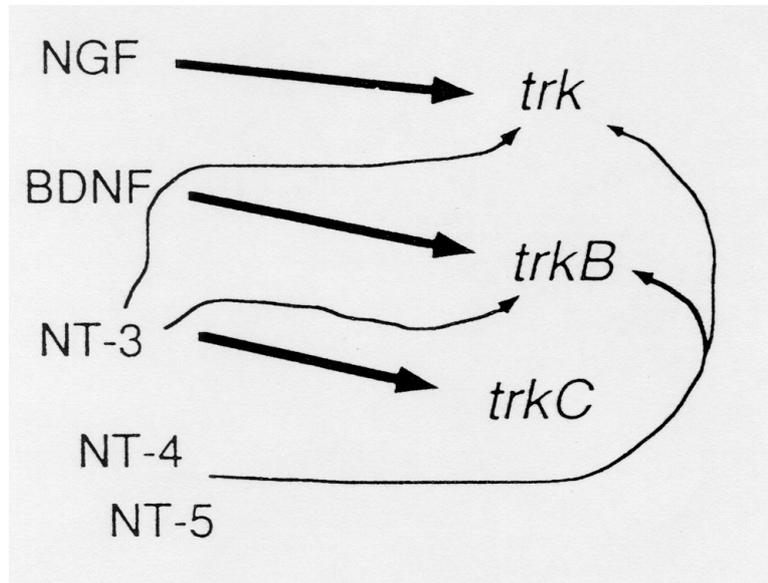


Figura 3.1. Interacciones entre las NT's y los receptores Trk (adaptado de: Chao, 1992a).

La expresión de *Dtrk* está regulada durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, detectándose niveles elevados de expresión de este gen en las regiones neurales durante la embriogénesis precoz y media, mientras que se produce una disminución hasta niveles casi indetectables en la embriogénesis tardía. Durante el desarrollo postembrionario se detectan niveles elevados de proteína Dtrk en regiones neurales como los centros ópticos proliferativos del cerebro y en un subconjunto de neuroblastos en el ganglio ventral de *Drosophila* (Barbacid et al., 1991; Pulido et al., 1992).

Aunque nuestro interés en este miembro de la familia de receptores Trk es claramente menor, su existencia sugiere que estos receptores han evolucionado a partir de un único gen ancestral que existía ya antes de la separación filogenética entre artrópodos y cordados hace 800 millones de años (Barbacid et al., 1991; Pulido et al., 1992).

3.1.2.5 El receptor trkE

El quinto y último miembro de la familia Trk ha sido recientemente identificado en los keratinocitos humanos (Di Marco et al., 1993a). Aunque está claro que el receptor TrkE pertenece a la familia de los receptores Trk, su dominio extracelular no posee analogía significativa con ninguna otra proteína conocida. De hecho, su pertenencia a la familia Trk se basa en el grado de homología de secuencia y la presencia de características de los receptores Trk localizados en el dominio intracelular (Di Marco et al., 1993a, 1993b).

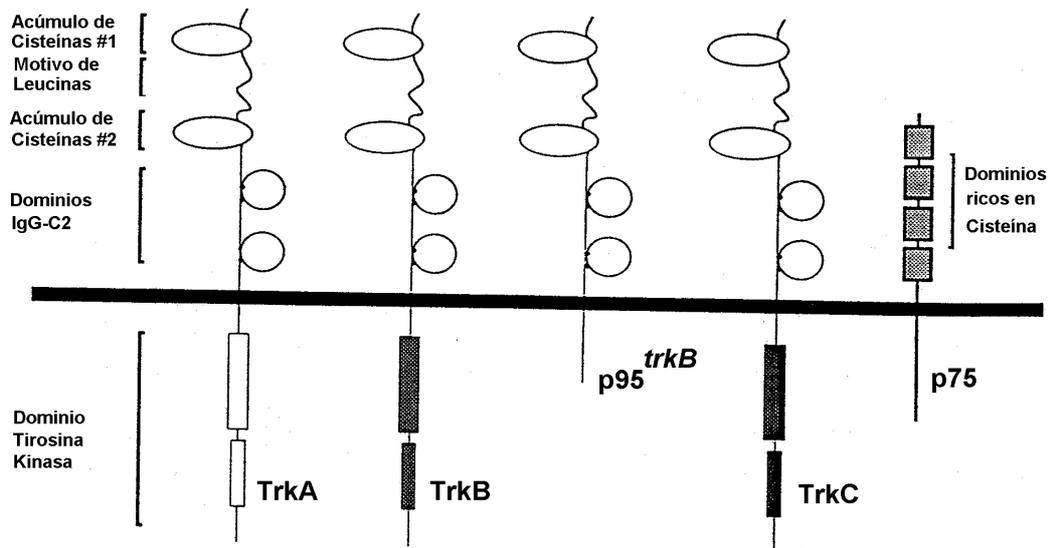


Figura 3.2. Estructura de los receptores de las NT's (adaptado de: Chao et al., 1992a).

3.1.2.6 La naturaleza molecular de los receptores de alta afinidad

Si bien hoy por hoy está clara la estructura del receptor de baja afinidad de las NT's, existe una discusión abierta sobre la naturaleza molecular del receptor de alta afinidad de las NT's. Dicha controversia se ha articulado en dos modelos hipotéticos.

El primero de ellos, denominado *modelo heterodímero p75/Trk* (Hempstead et al., 1991), establece que los sitios de unión de alta afinidad para las diferentes NT's están formados por la asociación de p75 y los respectivos receptores Trk. Tanto el receptor Trk como p75 individualmente, tendrían las características de unión de un receptor de baja afinidad (Kaplan et al., 1991a), pero la coexpresión de p75 y el receptor Trk propiciaría la generación de sitios de alta afinidad (Hempstead et al., 1989, 1991; Matsushima y Bogenmann, 1990; Soppet et al., 1991; Pleasure et al., 1992; Battleman et al., 1993; Mahadeo et al., 1994; Verdi et al., 1994a; Huber y Chao, 1995).

Sin embargo, durante muchos años se cuestionaba este modelo al no poderse demostrar, a pesar de los reiterados intentos, la existencia de una asociación física directa entre los receptores Trk y p75 (Meakin y Shooter, 1991a, 1992; Hartmann et al., 1992; Jing et al., 1992). Más recientemente, se ha podido demostrar la capacidad de TrkA para inmovilizar p75 en la membrana celular, formando así complejos receptores de alta afinidad (Huber y Chao, 1995; Wolf et al., 1995). De hecho, en los últimos años se han publicado una serie de trabajos que han reimpulsado el *modelo heterodímero Trk/p75*. En primer lugar, para que se generen receptores de alta afinidad para NGF, es precisa la presencia de al menos aproximadamente diez veces más receptores p75 que receptores TrkA (Mahadeo et al., 1994). Aparentemente la coexpresión de p75 y un receptor Trk resulta en un incremento de la sensibilidad a la NT correspondiente (Scheibe y Wagner, 1992; Benedetti et al., 1993; Davies et al., 1993a; Lee et al., 1994b) y una mayor discriminación de las NT's (Benedetti et al., 1993). Se ha hipotetizado que el dominio citoplasmático de p75 podría interactuar con el receptor Trk, puesto que la unión de alta afinidad de las NT's parece requerir el dominio citoplasmático de p75 para una adecuada señalización transmembranaria (Volonté y Greene, 1989; Hempstead et al., 1989; 1990, 1991; Yan et al., 1991; Battleman et al., 1993). Cuando se

introducen mutaciones en el dominio citoplasmático de p75, estas moléculas son incapaces de generar sitios de unión al NGF de alta afinidad (Hempstead et al., 1990).

La segunda hipótesis, la del *modelo homodímero Trk*, establece que el receptor de alta afinidad está constituido exclusivamente por el receptor Trk (Cordon-Cardo et al., 1991; Klein et al., 1991a; Weskamp y Reichardt, 1991; Ibáñez et al., 1992; Jing et al., 1992; Meakin et al., 1992). De acuerdo con esta teoría, el receptor Trk *per se* sería capaz de interaccionar con la NT correspondiente con alta afinidad así como desencadenar las respuestas biológicas. A favor de este modelo, están las observaciones de que el NGF es capaz de unirse con alta afinidad a TrkA en ausencia de p75 y de inducir una respuesta de proliferación, supervivencia y/o diferenciación, tanto en células no neuronales (Klein et al., 1991a; Nebreda et al., 1991) como en células neuronales (Loeb et al., 1991). Este modelo presupone que p75 no participa de los receptores de alta afinidad para las NT's. De hecho, anticuerpos policlonales dirigidos contra p75 no reconocen los receptores de alta afinidad ni en células PC12 ni en cultivos primarios de ganglios espinales (Meakin y Shooter, 1991a; Weskamp y Reichardt, 1991). Por otra parte, moléculas mutadas de NGF incapaces de interaccionar con p75, sí pueden mediar la supervivencia y el crecimiento neurítico en cultivos neuronales (Drinkwater et al., 1991; Ibáñez et al., 1992).

En cualquier caso, resulta evidente que se debe ser muy precavido a la hora de interpretar gran parte de los experimentos que respaldan ambos modelos, dado que un determinado receptor puede comportarse de formas muy diferentes en función del tipo celular en que se exprese. Esto es especialmente cierto cuando se comparan células de estirpe neuronal o no neuronal con neuronas primarias (Chao et al., 1992; Ip et al., 1993d; Zhou et al., 1994).

3.2 El patrón de expresión de los receptores de las neurotrofinas

Múltiples estudios de expresión génica (mediante análisis *Northern blot* e hibridación *in situ*), inmunohistoquímica e inmunocitoquímica, indican que los diferentes receptores de las NT's se expresan de forma preferencial, aunque no exclusiva, en el SN. El patrón específico de expresión de algunos receptores, especialmente los de la familia Trk, ha sugerido la presencia de distintas poblaciones y subpoblaciones neuronales sensibles a las diversas NT's, tanto en el SNC como en el SNP.

3.2.1 El receptor p75

El receptor p75 se expresa ampliamente, tanto en tejidos neuronales como no neuronales (Yan y Johnson, 1987; Escandón y Chao, 1989, 1990). En el SNC, es posible detectar niveles particularmente elevados de ARNm para p75 y del propio receptor en el cerebro -más evidente en el córtex frontal, el hipocampo y los núcleos de la base-, en el cerebelo -células de Purkinje, capa granulosa externa y núcleos profundos- y en la médula espinal. Por otra parte, también es muy marcada la expresión de p75 en el SNP, incluyendo las neuronas de los ganglios espinales, las células de Schwann de los nervios espinales y las neuronas del sistema nervioso simpático (SNS) (Richardson et al., 1986; Taniuchi et al., 1986a, 1986b, 1988; Angelucci et al., 1988; Buck et al., 1988; Schatteman et al., 1988; Ernfors et al., 1988, 1991b; Heuer et al., 1990a; Seidl y Holstein, 1990; Wanaka y Johnson, 1990; MacGrogan et al., 1992; Wheeler y Bothwell, 1992; Rocamora et al., 1993; Lomen-Hoerth y Shooter, 1995). La expresión de p75 en la médula espinal se inicia en estadios prematuros del desarrollo embrionario (Large et al., 1989; Heuer et al., 1990a, 1990b; Escandón et al., 1994). En las etapas más precoces sólo las MTN's espinales expresan p75 (Raivich et al.,

1985; Yan et al., 1988; Yan y Johnson, 1988, 1989; Ernfors et al., 1988, 1989), extendiéndose posteriormente a otras células. Pero p75 también se expresa en los testículos, el intestino delgado, los ganglios linfáticos, el bazo, el timo y, a niveles más reducidos, en el tejido muscular, los pulmones, el riñón, el esófago, el corazón y el hígado (Heuer et al., 1990a; Persson et al., 1990; Wyatt et al., 1990; Sariola et al., 1991).

3.2.2 Los receptores *Trk*

La expresión del gen *trkA* está limitada a tejidos del SN. A nivel del SNC, el receptor TrkA y su ARNm se localizan en poblaciones neuronales definidas de los núcleos de la base encefálica, el tálamo, el *neostriatum* y el tronco encefálico (Vázquez y Ebendal, 1991; Merlio et al., 1992; Steininger et al., 1993; Venero y Hefti, 1993; Holtzman et al., 1992, 1995; Shelton et al., 1995). También se ha detectado expresión de TrkA en las células ganglionares de la retina embrionaria (Zanellato et al., 1993). En el SNP, es posible detectar el inicio de la expresión de TrkA durante el desarrollo embrionario en las neuronas sensoriales de los ganglios espinales y viscerales y en la porción de neuronas sensoriales de los ganglios craneales que tienen su origen en la cresta neural (Martín-Zanca et al., 1990; Mu et al., 1993; Zhang et al., 1994b; Shelton et al., 1995; Williams et al., 1995). Del conjunto de neuronas de los ganglios espinales, son las más pequeñas las que expresan el receptor TrkA preferentemente (Mu et al., 1993; Zhang et al., 1994b; Wright y Snider, 1995). También se expresa en los ganglios simpáticos (Martín-Zanca et al., 1990; Schecterson y Bothwell, 1992; Tessarollo et al., 1993; Zhang et al., 1994b). Fuera del SN, se han identificado transcritos de *TrkA* en estructuras y células del sistema inmune así como en el riñón, el tejido muscular y los pulmones (Ehrhard et al., 1993a, 1993b; Lomen-Hoerth y Shooter, 1995), aunque se desconoce qué funciones tienen los receptores TrkA en dichas localizaciones.

La expresión de *trkB* parece reflejar la red completa del SNC y del SNP durante el desarrollo embrionario, de forma que los transcritos de *trkB* se localizan en células derivadas tanto del neuroepitelio como de la cresta neural (Klein et al., 1990a, 1990b; Dechant et al., 1993b; Escandón et al., 1994; Shelton et al., 1995). A nivel del SNC, tanto embrionario como adulto, el receptor TrkB y su ARNm se localizan principalmente en el encéfalo y, en menor grado, en la médula espinal (Klein et al., 1990a; Merlio et al., 1992; Escandón et al., 1994; Shelton et al., 1995; Yan et al., 1997). En concreto, se detecta expresión de TrkB en el córtex cerebral, el lóbulo olfatorio, el tálamo y el hipotálamo, las células piramidales del hipocampo (Klein et al., 1990a, 1990b), las células granulosas del cerebelo (Klein et al., 1990a, 1990b; Merlio et al., 1992), las células del *tectum* óptico (Escandón et al., 1994) y las células ganglionares de la retina (Jelsma et al., 1993; Escandón et al., 1994). Por último, las MTN's espinales y del tronco encefálico, adultas y embrionarias, también expresan TrkB (Ernfors et al., 1992; Merlio et al., 1992; Yan et al., 1993, 1994).

Por otra parte, se ha detectado la presencia de la isoforma gp95^{*trkB*} en los plexos coroideos y en el revestimiento ependimal de los ventrículos (Klein et al., 1990b), así como en la superficie de diversos tipos de células gliales (Frisen et al., 1992, 1993; Beck et al., 1993; Merlio et al., 1993; Rudge et al., 1994; Roback et al., 1995; Wetmore y Olson, 1995). Curiosamente, la proporción de formas truncadas se incrementa progresivamente durante el desarrollo embrionario (Allendoerfer et al., 1992). A nivel del SNP, una subpoblación de las neuronas sensoriales de los ganglios espinales expresa TrkB (Carroll et al., 1992; Shelton et al., 1995; Wright y Snider, 1995). En los troncos nerviosos periféricos, las células de Schwann también expresan la forma truncada del receptor TrkB (Frisen et al., 1993; Offenhäuser et al., 1995). Las formas truncadas y catalíticas de TrkB se regulan de forma diferente durante el desarrollo

así como en relación con las lesiones neuronales, al menos en el SNC (Beck et al., 1993; Frisen et al., 1993; Merlio et al., 1993; Escandón et al., 1994). Tras producirse la lesión, se observa un incremento pronunciado de la expresión de las formas truncadas de TrkB, mientras que las formas catalíticas casi no ven alterada su expresión (Beck et al., 1993; Frisen et al., 1993; Merlio et al., 1993). Sin embargo, en el SNP no se han confirmado estas observaciones (Frisen et al., 1993; Funakoshi et al., 1993; Sebert y Shooter, 1993). Por último, el receptor TrkB también es detectable a niveles reducidos en los pulmones, el bazo y los ganglios linfáticos, la glándula submaxilar, los músculos, los testículos y los ovarios (Klein et al., 1989, 1990b; Middlemas et al., 1991; Lomen-Hoerth y Shooter, 1995; Shelton et al., 1995).

El receptor TrkC también se expresa en un gran número de células y estructuras del SN, aunque los estudios realizados hasta la fecha no discriminan entre las diferentes isoformas de este receptor. En las etapas más precoces del desarrollo embrionario, se puede detectar expresión del gen *TrkC* en el neuroectodermo (Tessarollo et al., 1993). En etapas posteriores del desarrollo, es posible detectar ARNm para TrkC en prácticamente toda la extensión del SNC (incluyendo el telencéfalo, el diencefalo, el mesencéfalo, el rombencéfalo y el tubo neural), así como en ciertas estructuras del SNP como los ganglios sensoriales espinales y algunos craneales (Tessarollo et al., 1993; Escandón et al., 1994; Kahane y Kalcheim, 1994; Lamballe et al., 1994; Zhang et al., 1994b; Shelton et al., 1995). A nivel de los ganglios espinales y trigéminos embrionarios, sólo una subpoblación de neuronas sensoriales expresan receptores TrkC (Tessarollo et al., 1993; Williams et al., 1993; Lamballe et al., 1994; Zhang et al., 1994b; Shelton et al., 1995; Wright y Snider, 1995).

En la edad adulta, la expresión de TrkC se mantiene en múltiples estructuras del SNC, como el córtex cerebral, el hipocampo, el tálamo y el hipotálamo, la *substantia nigra*, algunos núcleos del

Estructura	TrkA	TrkB	TrkC
Sistema Nervioso Central			
Prosencéfalo			
Córtex Cerebral	-	++	++
Cuerpo Caloso	-	-	n.d.
Hipocampo	-	++	++
Fimbria del Hipocampo	-	-	n.d.
Prosencéfalo Basal	++	++	++
<i>Striatum</i>	+	++	+
Diencéfalo			
Tálamo	+	++	+
Hipotálamo	-	++	++
Núcleo Habenular Medio	-	++	+
<i>Substantia nigra</i>	-	+	n.d.
Núcleo Interpeduncular	-	+	+
Mesencéfalo			
Núcleo Rojo	-	+	n.d.
Colículo Superior	-	+	+
Tronco del Encéfalo			
Cerebelo: Células de Purkinje	-	++	-
Cerebelo: Células Granulosas	-	-	++
Núcleos Pontinos	-	+	+
Núcleo Ambiguo	-	++	n.d.
Otras Estructuras			
Médula Espinal	-	++	++
Plexo Coroideo	-	++	-
Revestimiento Ependimario	-	++	-
Retina	-	++	n.d.
Nervios Oftálmicos	-	++	n.d.
Sistema Nervioso Periférico			
Ganglios Craneales			
V	++	+	+
VII	-	++	++
VIII	-	++	++
IX/X Superior	++	++	++
IX/X Inferior	-	++	++
Ganglios Espinales			
Neuronas de Pequeño Tamaño	++	-	-
Neuronas de Mediano Tamaño	-	+	-
Neuronas de Gran Tamaño	-	-	+
Otras Estructuras			
Ganglios Simpáticos	++	+	+
Oído Interno	-	+	n.d.
Epitelio Olfatorio	-	+	+
Sistema Nervioso Entérico			
Ganglios Entéricos	-	-	++
Estructuras Ajenas al Sistema Nervioso			
Arterias (Mesénquima Subendotelial)	-	-	++
Diafragma	-	-	++
Tejido Adiposo Multilocular	-	-	+
Conductos Mesofrénico y Urogenital	-	-	+
Paladar, Lengua y Esbozos Dentarios	-	+	+
Narinas	-	+	+
Glándulas Submaxilares	-	+	++

Tabla 3.1. Expresión de la familia de receptores Trk en el SN murino (adaptado de: Barbacid, 1994).

tronco encefálico y la columna motora de la médula espinal (Merlio et al., 1992; Tessarollo et al., 1993; Escandón et al., 1994; Lamballe et al., 1994; Shelton et al., 1995). También es reseñable la expresión de receptores TrkC en las células satélites y de Schwann en los ganglios espinales, así como en casi todas las células gliales de la médula espinal (Carroll et al., 1992; Ernfors et al., 1992; Mu et al., 1993; Yan et al., 1993; Offenhäuser et al., 1995). Muchos de estos receptores TrkC, especialmente los presentes en las células gliales y de Schwann, son isoformas que carecen del dominio catalítico (Klein et al., 1990b; Middlemas et al., 1991; Lamballe et al., 1993; Tsoulfas et al., 1993; Offenhäuser et al., 1995). El receptor TrkC es el único de la familia que está presente en el SNE (Tessarollo et al., 1993; Lamballe et al., 1994). Durante el desarrollo embrionario también es posible detectar la expresión del receptor TrkC en varias estructuras fuera del SN, tales como el epitelio olfatorio, las glándulas sublinguales, las papilas dentales, las *vibrissae* de las narinas, el mesénquima subendotelial de las arterias, estructuras renales, la glándula adrenal y el tejido adiposo (Tessarollo et al., 1993; Lamballe et al., 1994; Shelton et al., 1995).

Por último, llama la atención que el receptor TrkE es el primer miembro de la familia de receptores Trk que se expresa preferente y abundantemente fuera del SN (Di Marco et al., 1993a, 1993b).

3.3 Las funciones biológicas de los receptores de las neurotrofinas

3.3.1 Los receptores Trk

Los receptores de alta afinidad son los responsables de la mediación de la mayoría de efectos biológicos inducidos por las NT's, incluídas las respuestas de diferenciación y supervivencia neuronal (Greene, 1977b; Zimmerman et al., 1978; Sutter et al., 1979b; Sonnenfeld

e Ishii, 1985; Hosang y Shooter, 1987). Sin embargo, la misma controversia que existe sobre la naturaleza molecular de los receptores de alta afinidad se ha trasladado a la participación de los diferentes receptores conocidos, p75 y la familia Trk, en la mediación de los efectos biológicos. Resulta obvio que, independientemente de la función de p75, la activación de los receptores Trk de las NT's es crucial y necesaria para el desencadenamiento de la mayoría de las respuestas celulares a las NT's (Cordon-Cardo et al., 1991; Glass et al., 1991; Klein et al., 1991b; Lamballe et al., 1991; Loeb et al., 1991; Nebreda et al., 1991; Soppet et al., 1991; Weskamp y Reichardt, 1991; Birren et al., 1992; Carroll et al., 1992; Hempstead et al., 1992; Ibáñez et al., 1992; Loeb et al., 1992; Allsopp et al., 1993a; Rovelli et al., 1993; Clary et al., 1994; Hartman y Hertel, 1994; Matsushima y Bogenmann, 1994; Verdi et al., 1994b; Xu et al., 1994; Zhou et al., 1994; Lavenius et al., 1995; Poluha et al., 1995; von Bartheld et al., 1996), incluida la internalización y el transporte retrógrado de las NT's (DiStefano et al., 1992; Loeb y Greene, 1993; von Bartheld et al., 1996). La activación del dominio catalítico de los receptores Trk es necesaria y suficiente para desencadenar la mayoría de los efectos biológicos de las NT's en las células neuronales.

La identificación de diferentes isoformas catalíticas y no catalíticas de los receptores Trk generadas a través de mecanismos de *splicing* alternativo (Klein et al., 1990b; Middlemas et al., 1991; Lamballe et al., 1991, 1993; Dechant et al., 1993b; Tsoulfas et al., 1993; Valenzuela et al., 1993; Garner y Large, 1994; Vinh et al., 1994; Shelton et al., 1995) ha planteado la existencia de nuevos procesos de regulación de las respuestas celulares a las NT's mediadas por los receptores Trk. Aunque todavía se desconocen en gran medida las funciones de las diferentes isoformas, éstas difieren en su capacidad para señalar y/o interactuar con sus ligandos preferidos. Por ejemplo, se ha comprobado cómo las isoformas catalíticas de TrkC con una inserción a nivel de su dominio TK intracitoplasmático son capaces de mediar respuestas de diferenciación y

transformación, aunque no de supervivencia (Garner y Large, 1994). En cambio, en los mamíferos se han identificado isoformas catalíticas incapaces de estimular la neuritogénesis (Lamballe et al., 1993; Tsoulfas et al., 1993).

Por consiguiente, es concebible que distintas isoformas de receptores Trk sean responsables de la mediación de un subgrupo de respuestas, y que la activación de múltiples receptores Trk diferentes sea precisa para obtener toda la gama de efectos biológicos de las NT's. También se ha demostrado cómo, además de la función de señalización intracelular, los receptores TrkB y TrkC también podrían funcionar como moléculas de adhesión neuronal, ya que presentan en sus dominios extracelulares motivos homólogos con repeticiones presentes en moléculas de adhesión celular tipo N-CAM (Schneider y Schweiger, 1991; Tannahill et al., 1995).

Todavía se dispone de muy poca información sobre la funcionalidad de las formas truncadas de los receptores TrkB y TrkC. Es posible que interaccionen con otras subunidades ancladas en la membrana celular con capacidad de señalización intracelular. También se ha sugerido en base al patrón de expresión de las isoformas truncadas de TrkB -a nivel del revestimiento endotelial y los plexos coroideos-, su implicación en la eliminación y/o transporte activo del BDNF (y presumiblemente otras NT's) al interior del cerebro y a través de la barrera hematoencefálica, para a continuación poder actuar sobre los receptores TrkB catalíticos presentes a nivel del córtex cerebral y del hipocampo (Klein et al., 1990a; Barbacid et al., 1991). Otra posibilidad es que los receptores truncados actúen como inhibidores negativos dominantes de sus isoformas catalíticas, al menos en aquellas células en las que se coexpresen. Tras interaccionar con su correspondiente ligando, las formas truncadas podrían formar heterodímeros inactivos con las formas catalíticas de los receptores Trk.

Alternativamente, las formas no catalíticas podrían competir con las formas catalíticas por el ligando o incluso podrían actuar formando barreras contra la difusión de las NT's (Rudge et al., 1994). Por otra parte, se ha demostrado cómo las formas truncadas de TrkB eliminan rápidamente su ligando mediante internalización (Biffo et al., 1995). La inducción de las formas truncadas de TrkB en las células gliales en relación con lesiones neuronales, ha propiciado la hipótesis de que estén implicadas en el reclutamiento de ligando y/o la presentación durante el crecimiento y/o regeneración axonal (Klein et al., 1990b; Frisen et al., 1992, 1993; Beck et al., 1993; Merlio et al., 1993).

3.3.2 *El receptor p75*

A pesar de que en un principio se desconocían respuestas biológicas mediadas únicamente por el receptor de baja afinidad (Chao et al., 1986; Seilheimer y Schachner, 1987; Hempstead et al., 1988, 1989; Drinkwater et al., 1991; Glass et al., 1991; Klein et al., 1991a; Loeb et al., 1991; Represa et al., 1991; Saad et al., 1991; Weskamp y Reichardt, 1991; Ibáñez et al., 1992; Jing et al., 1992; Rodríguez-Tébar et al., 1992; Ip et al., 1993d; Loeb y Greene, 1993), en los últimos años han aparecido una serie de estudios que indican que p75 es importante *per se* en la función neurotrófica, delineando funciones específicas para dicho receptor en la señalización neurotrófica (Matsushima y Bogenmann, 1990; Yan et al., 1991; Berg et al., 1991; Pleasure et al., 1992; Davies et al., 1993a; Barker y Shooter, 1994; Hantzopoulos et al., 1994; Verdi et al., 1994a; Dostaler et al., 1996).

La demostración más contundente de la relevancia de p75 para la señalización neurotrófica la constituye el análisis de animales mutantes homocigotos para p75 (Lee et al., 1992a). Dichos animales presentan deficiencias pronunciadas a nivel de la sensibilidad térmica debido a una

pérdida de neuronas y fibras sensoriales periféricas implicadas en la nocicepción y la termocepción (Lee et al., 1992a). Asimismo, en estos animales la inervación de algunas dianas simpáticas parece depender de p75 (Lee et al., 1994a). Por otra parte, en etapas precoces del desarrollo embrionario durante la fase de independencia neurotrófica, p75 puede transducir señales en relación con la maduración neuronal a través de mecanismos autocrinos y/o paracrinos (Wright et al., 1992).

Una de las funciones más novedosas sugeridas para p75 es su participación en la discriminación entre diferentes factores neurotróficos, contribuyendo así a modular la respuesta celular a las diversas NT's. En concreto, p75 parece ser especialmente relevante para la señalización inducida por la NT-4/5 (Rydén et al., 1995). Aunque se ha demostrado que p75 es capaz de unirse a las distintas NT's con baja afinidad, las tasas de asociación y disociación varían considerablemente, teniendo el NGF las más rápidas y el BDNF las más lentas (Rodríguez-Tébar et al., 1990, 1992). Estas diferencias probablemente guardan relación con los distintos cambios conformacionales que experimenta p75 al interactuar con cada una de las NT's (Timm et al., 1994).

El receptor p75 aparentemente aumenta la sensibilidad de los receptores Trk a las NT's (Benedetti et al., 1993; Davies et al., 1993a; Barker y Shooter, 1994; Hantzopoulos et al., 1994; Lee et al., 1994b; Verdi et al., 1994a). De nuevo, parecen existir diferencias en la acción moduladora de p75 sobre la función de los distintos receptores Trk (Hantzopoulos et al., 1994), presumiblemente a través de la interacción física entre los diferentes receptores y la afectación directa de la función de los receptores Trk, o a través de la actuación sobre las vías de señalización activadas por dicho receptor. Otra posibilidad es que los receptores p75 actúen como "presentadores" de las NT's para los receptores Trk (Jing et al., 1992; Ibáñez et al., 1993), consiguiendo así un incremento de la concentración local de las NT's alrededor de los

receptores Trk (Barker y Shooter, 1994). En cualquier caso, parece claro que la acción discriminadora de p75 podría depender de su capacidad de interaccionar físicamente de forma diferenciada con los diversos receptores Trk y/o factores neurotróficos.

La función moduladora y discriminadora de la acción de las NT's atribuída a p75 tiene traducción a nivel fisiológico; p75 incrementa la capacidad de respuesta de las neuronas a las NT's en estadios específicos de la maduración neuronal (Davies et al., 1993a; Barrett y Bartlett, 1994) e influye sobre la cinética de la maduración neuronal (Verdi et al., 1994a) y el crecimiento neurítico (Dostaler et al., 1996). Incluso se ha sugerido que p75 podría ser relevante en mecanismos autocrinos (Hantzopoulos et al., 1994). Asimismo, el receptor p75, como mediador del transporte retrógrado de las NT's (Korsching y Thoenen, 1983b; Palmetier et al., 1984; Taniuchi y Johnson, 1985; Johnson et al., 1987; Raivich y Kreutzberg, 1987a; Raivich et al., 1991; Yan et al., 1993; von Bartheld et al., 1996), también actúa de forma diferencial según la NT (Curtis et al., 1995).

Para sorpresa de muchos investigadores, se ha comprobado en los últimos años que p75 puede mediar la muerte apoptótica de células neuronales (Rabizadeh et al., 1993; Barrett y Bartlett, 1994; Rabizadeh y Bredesen, 1994; von Bartheld et al., 1994; Cortazzo et al., 1996; Cheema et al., 1996; Frade et al., 1996; Bunone et al., 1997) y gliales (Casaccia-Bonnet et al., 1996). Sin embargo, la capacidad de p75 para inducir la muerte neuronal no debe resultarnos tan sorprendente si recordamos que p75 pertenece a una superfamilia de receptores con capacidad de señalar la muerte celular, como son el antígeno Fas o los receptores del TNF (revisado en Apartado 3.1.1).

En ausencia del NGF, p75 induce la muerte de células neuronales sensibles a dicha NT, mientras que en su presencia p75 pierde sus

propiedades letales (Rabizadeh et al., 1993; Bunone et al., 1997). No obstante, en presencia de un receptor Trk, p75 pierde su capacidad para mediar tanto la muerte neuronal apoptótica por deprivación neurotrófica (Barrett y Bartlett, 1994) como la supervivencia neuronal en presencia de la NT correspondiente (Tagliatela et al., 1996). Por contra, es el receptor Trk el que “domina” la mediación de la acción inhibitoria de la muerte neuronal de las NT's (Tagliatela et al., 1996).

Independientemente de esta circunstancia, se ha propuesto que p75 puede favorecer la muerte o supervivencia de las células neuronales en dependencia del estado del desarrollo embrionario (Barrett y Bartlett, 1994; Frade et al., 1996). En el caso de las neuronas sensoriales, durante el período de inervación de las dianas p75 es aparentemente necesario para su supervivencia estimulada por el NGF, mientras que en etapas más tardías del desarrollo embrionario p75 probablemente media una señal apoptótica (Barrett y Bartlett, 1994). En la edad postnatal, el bloqueo de la expresión de p75 permite evitar la muerte apoptótica de neuronas sensoriales inducida por axotomía (Cheema et al., 1996). También resulta llamativo que las MTN's de la médula espinal incrementen su nivel de expresión y síntesis de p75 en las fases previas al período de muerte fisiológica durante el desarrollo embrionario (Raivich et al., 1985; Yan y Johnson, 1987; Méttling et al., 1995), si bien la función biológica del receptor p75 en las MTN's espinales durante este período del desarrollo no está clara (Arakawa et al., 1990; Oppenheim et al., 1992; Henderson et al., 1993a).

El receptor p75 también participa en el proceso de regeneración nerviosa (revisado en Apartado 4.2). Tras producirse la lesión de un nervio periférico en la edad adulta, se origina un incremento muy importante de la expresión de p75 en el segmento distal del nervio lesionado que se localiza a nivel de las células de Schwann (Taniuchi et al., 1986b, 1988). Esta inducción se produce independientemente del

tipo neuronal envuelto por las células de Schwann, observándose indistintamente en diversos tipos de troncos nerviosos, incluyendo los motores (Heumann et al., 1987a, 1987b; Taniuchi et al., 1986b, 1988).

Los receptores p75 presentes sobre la superficie de las células de Schwann podrían funcionar como receptores de presentación, logrando así una mayor concentración local de la correspondiente NT (Seilheimer y Schachner, 1987; Johnson et al., 1988a; Taniuchi et al., 1988). A medida que los axones en proceso de regeneración van contactando con las células de Schwann, disminuye la presencia de p75 en su superficie celular (Yan y Johnson, 1987, 1988; Lemke y Chao, 1988; DiStefano y Chelsea, 1990). Se ha sugerido que un mecanismo similar podría existir durante el desarrollo embrionario para regular la migración axonal (Johnson et al., 1988a). Asimismo, se ha apuntado la posible participación de p75 en la migración de las células de Schwann -que sólo expresan p75 y no receptores Trk catalíticos- durante el desarrollo embrionario y los procesos de regeneración nerviosa (Anton et al., 1994). En concreto, el NGF estimula a través de p75 la expresión de varias glicoproteínas en la superficie de las células gliales (Seilheimer y Schachner, 1987; Saad et al., 1991).

3.4 El transporte retrógrado de las neurotrofinas

El mecanismo de transferencia de información desde el tejido diana de inervación a los somas neuronales, constituye un caso especial de transducción de señales, ya que la activación de los receptores se sitúa a una larga distancia del núcleo de la neurona. En general, dicha distancia se corresponde con el axón y, en ocasiones, puede ser superior a un metro. Tras producirse la interacción entre una NT y su respectivo receptor a nivel de los terminales nerviosos (Dumas et al., 1979; Schwab et al., 1982), el complejo ligando-receptor es internalizado en un proceso

que reúne las características de endocitosis mediada por el receptor de alta afinidad (Hendry, 1975b; Thoenen y Barde, 1980; Korsching y Thoenen, 1983a; Layer y Shooter, 1983; Bernd y Greene, 1984; Green et al., 1986; Hosang y Shooter, 1987; DiStefano et al., 1992; Eveleth y Bradshaw, 1992; Yan et al., 1992, 1993) y que aparentemente depende de la interacción de la NT con el receptor Trk (y no p75) (Kahle et al., 1994).

A continuación, las NT's son transportadas retrógradamente a lo largo de los microtúbulos axonales hasta el soma de las neuronas (Stöckel et al., 1974, 1975a, 1976; Stöckel y Thoenen, 1975; Johnson et al., 1978; Dumas et al., 1979; Greene y Shooter, 1980; Korsching y Thoenen, 1983b; Schwab y Thoenen, 1983; Palmetier et al., 1984; Seiler y Schwab, 1984; Johnson et al., 1987; DiStefano et al., 1992). El transporte retrógrado de NT's precisa la unión de alta afinidad (Bernd y Greene, 1984; Hosang y Shooter, 1987; Koliatsos y Price, 1993; Loy et al., 1994; Ehlers et al., 1995; von Bartheld et al., 1996) así como la participación de p75 (Korsching y Thoenen, 1983b; Palmetier et al., 1984; Taniuchi y Johnson, 1985; Johnson et al., 1987; Raivich y Kreutzberg, 1987a; Raivich et al., 1991; Yan et al., 1993; Curtis et al., 1995; von Bartheld et al., 1996). Las NT's llegan intactas al soma neuronal (Hendry et al., 1974; Stöckel et al., 1976; Johnson et al., 1978; Dumas et al., 1979), donde se acumulan en el interior de compartimentos membranosos (Schwab, 1977; Schwab y Thoenen, 1977; Levi et al., 1980; Heumann et al., 1981) para ser degradadas seguidamente en estructuras lisosomales (Thoenen y Barde, 1980; Vale y Shooter, 1984).

Se desconoce hasta qué punto el transporte retrógrado de NT's es importante para su mecanismo de acción, aunque sí parece evidente que la interferencia con este transporte comporta la abolición de las acciones estimuladas por las NT's (Chen et al., 1977; Johnson, 1978; Korsching y Thoenen, 1983a; DiStefano et al., 1992). Inicialmente se sugirió la

posibilidad de que las moléculas neurotróficas fuesen transportadas retrógradamente hasta el soma neuronal, donde ejercerían sus efectos biológicos. Sin embargo, parece improbable que las propias NT's actúen como mensajeros neurotróficos a nivel del soma neuronal dado que ni la inyección intracelular de NT's no mimetiza sus efectos neurotróficos, ni la de anticuerpos anti-NT bloquea los efectos producidos por las NT's (Heumann et al., 1981).

Alternativamente, la transducción de señales podría originarse durante el propio transporte de los complejos NT-receptor. El transporte axonal de las NT's también podría formar parte de una vía de degradación que se encargaría de eliminar las moléculas tróficas del entorno de los terminales nerviosos y que finalizaría con la degradación de los factores neurotróficos en los cuerpos celulares de las neuronas. Sin embargo, no parece que el proceso de degradación de las NT's esté relacionado con sus mecanismos de acción (Layer y Shooter, 1983).

3.5 Los efectos de las neurotrofinas a nivel intracelular

En general, se acepta que las NT's transmiten su información a través de la fosforilación a nivel de residuos de tirosina, serina y treonina de una larga serie de substratos intracelulares (Maher, 1988; Meakin y Shooter, 1991a, 1991b), entre los que se incluyen diversos enzimas como las proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPK's, también conocidas como kinasas de regulación extracelular o ERK's) (Gotoh et al., 1990; Tsao et al., 1990; Boulton et al., 1991), la kinasa S6 y el factor traduccional eIF4E (Halegoua y Patrick, 1980; Blenis y Erikson, 1986; Matsuda et al., 1986; Mutoh et al., 1988, 1992; Frederickson et al., 1992), la proteína kinasa C (PKC) (Hama et al., 1986; Heasley y Johnson, 1989), la proteína kinasa N (PKN) (Rowland et al., 1987), la proteína SNT (*suc-associated neurotrophic factor-induced tyrosine-phosphorylated target*)

(Rabin et al., 1993; Widmer et al., 1993), la proteína kinasa A o dependiente de cAMP (PKA) (Hashimoto et al., 1985; Crémins et al., 1986), la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) (Nishibe et al., 1990; Vetter et al., 1991; Ohmichi et al., 1991a), la fosfatasa fosfotirosínica 1D (PTP1D) (Vogel et al., 1993; Sharma y Lombroso, 1995; Vambutas et al., 1995), la fosfoinositol-3 kinasa (PI-3K) (Carter y Downes, 1992; Raffioni y Bradshaw, 1992; Soltoff et al., 1992; Obermeier et al., 1993a, 1993b) o Raf-1 (Fabian et al., 1993).

Por otra parte, el NGF induce la fosforilación intracelular de diversas proteínas, como la tirosina hidroxilasa (Halegoua y Patrick, 1980; McTigue et al., 1985), la proteína Crk-II (Ribon y Saltiel, 1996), la CaM-BP100 (Brady y Palfrey, 1993), una proteína nuclear de 35 kDa conocida como SMP (*slow-migrating protein* ó proteína de migración lenta) (Yu et al., 1980; Nakanishi y Guroff, 1985) y una proteína citoesquelética de 250 kDa (Landreth y Reiser, 1985). El NGF tiene un efecto modulador de diversos componentes del citoesqueleto, probablemente en relación con su acción neuritogénica. Estabiliza el ARNm para la proteína GAP-43 (proteína de 43 kDa asociada al crecimiento) y las tubulinas α y β (Ferryhough e Ishii, 1987; Federoff et al., 1988; Perrone-Bizzozero et al., 1993) con el consiguiente efecto sobre la síntesis de tubulina (Drubin et al., 1985, 1988; Black et al., 1986), y aumenta considerablemente la síntesis de diversas MAP's (proteínas asociadas a microtúbulos) (Drubin et al., 1985, 1988; Black et al., 1986; Aletta et al., 1988; Brugg y Matus, 1988).

Por último, las NT's también estimulan la transcripción de genes de expresión precoz, entre los que se incluyen *c-fos* (Greenberg et al., 1985; Milbrandt, 1986; Zirrgiebel y Lindholm, 1996), *c-jun* (Wu et al., 1989), *c-myc*, NGFIA y NGFIB (Greenberg et al., 1985; Kruijer et al., 1985; Kujubu et al., 1987; Milbrandt, 1987, 1988; Altin et al., 1991b; Kendall et

al., 1994), así como la de los neuropéptidos neurotensina y neuromedina N (Tischler et al., 1991). Además, NGF induce la expresión más tardía de varios genes adicionales en células PC12. Son ejemplos la proteasa transina (Machida et al., 1989), la proteína integrante de los filamentos intermedios denominada periferina (Leonard et al., 1988; Thompson y Ziff, 1989), la proteína asociada a microtúbulos MAP1.2/1b/5 (Lewis et al., 1986), la glicoproteína de la superficie celular NILE/L1 (Salton et al., 1983; Sajovic et al., 1986), la proteína de los gránulos secretores VGF (Possena et al., 1989; Salton et al., 1991), la timosina b4 (Leonard et al., 1987) y el receptor p75 (Miller et al., 1991).

El análisis de los acontecimientos que siguen inmediatamente a la activación de los receptores Trk ha revelado una compleja red de vías de señalización que aún no se comprende totalmente, que incluye proteínas como p21ras, Grb2, Shc, Raf, MEK, MAPK, pp90Rsk o PKC, todas aparentemente implicadas en la diferenciación neuronal (revisado por: Blenis, 1993; Saltiel y Ohmichi, 1993; Figura 3.3). El hecho de la redundancia existente a nivel de la transducción de señales implicadas en la promoción de diferenciación y supervivencia por las NT's así como que la información ha sido mayoritariamente obtenida a partir de diferentes tipos celulares, sugiere que se debe ser extremadamente cauto cuando se obtienen conclusiones sobre los acontecimientos de transducción que ocurren por debajo de los receptores para las NT's activados. Sirva como ejemplo la aparente diferencia existente en los mecanismos de transducción iniciados por el NGF entre las neuronas simpáticas y sensoriales del embrión de pollo (Borasio et al., 1993). Esta observación podría reflejar cómo un mismo receptor para una determinada NT en distintos tipos celulares, incluso neuronales, puede diferir en las respuestas que desencadena porque no fosforila ni activa necesariamente los mismos substratos, o por lo menos de la misma forma (Klinz y Heumann, 1995). Por último, los receptores de las NT's

podrían tener una función transductora de señales diferente de su actividad proteína TK.

3.6 La transducción de señales mediada por los receptores Trk

Los receptores Trk son considerados como una subfamilia integrada en la gran familia de receptores con actividad TK. En esta gran familia, se incluyen más de 30 receptores como los de la insulina, el EGF, el PDGF, los FGF's, etc. (revisado por: Cadena y Gill, 1994). Todos ellos comparten una serie de características a nivel estructural y de las vías de señalización que emplean. Este hecho ha facilitado enormemente el estudio de los mecanismos de transducción de señales utilizados por los receptores Trk. Es necesario reseñar que la gran mayoría de datos de que disponemos han sido obtenidos a partir del estudio del receptor TrkA. No obstante, existen evidencias de que los diferentes receptores Trk interaccionan de una forma similar con componentes de señalización a nivel intracelular (Xu et al., 1994).

3.6.1 La fosforilación de los receptores Trk

La fosforilación a nivel de residuos de tirosina de los receptores Trk es el primer paso en la activación de su dominio TK y el inicio de la transmisión de señales a nivel intracelular (revisado por: Kaplan y Stephens, 1994). La autofosforilación a nivel de residuos de tirosina es aparentemente un fenómeno generalizado en relación con la activación de los receptores TK por sus correspondientes ligandos. Los receptores, mediante su interacción con la NT, se dimerizan u oligomerizan, propiciando así la transfosforilación intermolecular de residuos de tirosina específicos de los receptores implicados (revisado por: Ullrich y Schlessinger, 1990). Con la fosforilación, los receptores experimentan un cambio conformacional de su dominio citoplasmático (Keating et al.,

1988), necesario tanto para su activación catalítica como para facilitar su interacción con substratos citoplasmáticos señalizadores (Kaplan y Stephens, 1994).

En el caso de TrkA, su activación catalítica se produce inmediatamente tras la interacción con su ligando preferido, el NGF (Kaplan et al., 1991a, 1991b; Klein et al., 1991a; Mitra, 1991). La actividad TK de TrkA es máxima entre 5 y 10 minutos tras la interacción con el NGF, atenuándose rápidamente (Klein et al., 1991a). Este mecanismo de activación pasa por la formación previa de homodímeros y, probablemente también, oligómeros de TrkA a través de la interacción con el NGF (Jing et al., 1992; Clary et al., 1994), así como por la autofosforilación del receptor TrkA a nivel de residuos de tirosina. Coherentemente con este modelo, diferentes inhibidores de kinasas, como la metil-5'-tioadenosina (MTA), el K252-a, el K252-b, la estaurosporina o algunas tirfostinas, neutralizan las acciones biológicas de las NT's a través de la inhibición de la autofosforilación y activación de los receptores Trk (Seeley et al., 1984; Kase et al., 1987; Hashimoto, 1988; Koizumi et al., 1988; Matsuda y Fukuda, 1988; Maher, 1988, 1989; Cho et al., 1989; Doherty y Walsh, 1989; Hashimoto y Hagino, 1989; Lazarovici et al., 1989; Smith et al., 1989b; Borasio, 1990; Miyasaka et al., 1990; Tischler et al., 1990; Knüsel y Hefti, 1991; Berg et al., 1992; Knüsel et al., 1992a, 1992b; Muroya et al., 1992a; Nye et al., 1992; Tapley et al., 1992; Ohmichi et al., 1992a, 1993a).

La internalización de las NT's parece depender de su interacción con el correspondiente receptor Trk, aunque no de la autofosforilación de este último (Kahle et al., 1994). Asimismo, se cree que la posterior reducción de la actividad catalítica de TrkA es debida a la desfosforilación e internalización de los receptores TrkA (Hempstead et al., 1992; Jing et al., 1992; Loeb y Greene, 1993; Yamada et al., 1994).

En los receptores Trk, la fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplasmático tiene dos funciones básicas. En primer lugar, se ha demostrado mediante experimentos de mutagénesis dirigida la existencia de tres residuos de fosfotirosina necesarios para la transfosforilación eficaz y eficiente de otros residuos de tirosina, a su vez esenciales para la propagación de la señal neurotrófica (Kaplan y Stephens, 1994). En segundo lugar, la fosforilación de los receptores Trk proporciona lugares de anclaje para proteínas diana específicas (revisado por: Schlessinger y Ullrich, 1992; Kaplan y Stephens, 1994). Estos lugares de autofosforilación representan estructuras de reconocimiento para proteínas con dominios de homología con Src tipo 2 (SH2). Los dominios SH2 son secuencias conservadas de aproximadamente 100 aminoácidos que se encuentran en varias moléculas de señalización y proteínas oncogénicas (revisado por: Cohen et al., 1995). Los dominios SH2 a menudo se acompañan de otras secuencias conservadas de aproximadamente 50 aminoácidos, denominadas dominios de homología con Src tipo 3 (SH3), que probablemente interactúan de forma cooperativa con dominios SH2, regulando así las interacciones entre proteínas durante la transducción de señales (Schlessinger y Ullrich, 1992; Cohen et al., 1995).

La interacción de los dominios SH2 con fosfotirosinas específicas presentes en los receptores TrkA permite la interacción específica con diversas proteínas reguladoras y enzimáticas, iniciándose así múltiples vías de señalización intracelular (revisado por: Koch et al., 1991). Hay especificidad porque los dominios SH2 reconocen no sólo los residuos de fosfotirosina sino también los tres residuos inmediatamente carboxi-terminales a la fosfotirosina (Fantl et al., 1992; Eck et al., 1993; Panayotou et al., 1993; Piccione et al., 1993; Songyang et al., 1993, 1994; Case et al., 1994; Marengere et al., 1994). De forma similar, la especificidad de los dominios SH3 parece estar determinada por los

aminoácidos variables que rodean los residuos invariables (Rickles et al., 1994; Musacchio et al., 1994; Erpel et al., 1995).

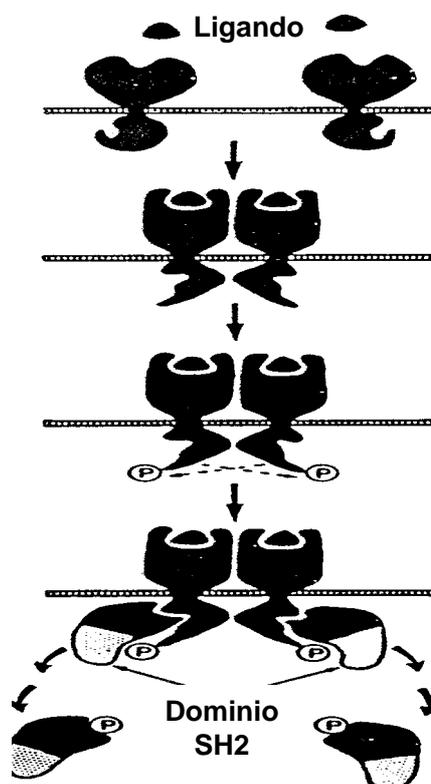


Figura 3.3. Modelo de la dimerización alostérica de los receptores Trk activados (adaptado de: Schlessinger y Ullrich, 1992).

Las proteínas con dominios SH2 que interactúan con los dominios intracitoplasmáticos fosforilados de los receptores Trk pueden dividirse en dos grupos. Una primera categoría incluye proteínas con actividad enzimática que se activan al interactuar con el receptor, ya sea por el mero hecho de la interacción o a través de su fosforilación a nivel de residuos de tirosina. Entre éstas se encuentran proteínas como la PLC- γ (Ohmichi et al., 1991a; Vetter et al., 1991; Obermeier et al., 1993a; Loeb et al., 1994; Middlemas et al., 1994; Stephens et al., 1994), la subunidad p85 de la PI-3K (Carter y Downes, 1992; Ohmichi et al., 1992b;

Raffioni y Bradshaw, 1992; Soltoff et al., 1992; Obermeier et al., 1993b), Erk1 (Loeb et al., 1992) o la proteína GAP (Obermeier et al., 1993b). El segundo grupo está integrado por proteínas que funcionan como adaptadores -permitiendo la aproximación del receptor a determinados substratos- o componentes reguladores de subunidades catalíticas específicas. Entre éstas destacan Grb2/Sem-5 (Rozakis-Adcock et al., 1992, 1993) y Shc (Obermeier et al., 1993b; Stephens et al., 1994).

Por otra parte, se han identificado diversos ligandos de los dominios SH3, entre los que se incluyen las proteínas mSOS, Grb2, GAP, PLC- γ y PI-3K (Bar-Sagi et al., 1993; Mayer y Baltimore, 1993; Feng et al., 1994; Musacchio et al., 1994; Yu et al., 1994). De hecho, se ha demostrado que los dominios SH3 de la PLC- γ y de Grb2 son responsables de su direccionalización a los microfilamentos del citoesqueleto y la membrana celular respectivamente (Bar-Sagi et al., 1993). También se ha implicado la participación de los dominios SH3 en la interacción entre el complejo Grb2-mSOS y proteínas con capacidad de modular la actividad de p21ras, como los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (Ye y Baltimore, 1994).

3.6.2 *La vía p21ras-MAPK*

3.6.2.1 Shc, Grb2/Sem-5 y mSOS

Las proteínas Shc son substratos importantes de la actividad fosforilativa a nivel de residuos de tirosina inducida por el NGF en las células neuronales (Rozakis-Adcock et al., 1992; Suen et al., 1993; Stephens et al., 1994; Ohmichi et al., 1994). El gen *shc* codifica proteínas de 48, 53 y 60 kDa de peso molecular, emparentadas entre sí a nivel de su secuencia aminoacídica (Pelicci et al., 1992). Las proteínas Shc no tienen función catalítica *per se*, sino que actúan como adaptadores que

median la asociación de proteínas adicionales con el receptor Trk activado (Pelicci et al., 1992; Obermeier et al., 1993b; Suen et al., 1993; Stephens et al., 1994). La interacción entre el dominio SH2 de la proteína adaptadora Shc (Pelicci et al., 1992) y la correspondiente fosfotirosina a nivel del receptor Trk activado (el residuo Tyr490 localizado en la región yuxtamembranaria, en el caso de TrkA) (Obermeier et al., 1993b; Stephens et al., 1994), inicia una vía de señalización que conocemos como la vía p21ras-MAPK, que aparentemente es crítica para las respuestas de diferenciación neuronal en relación con la estimulación neurotrófica (revisado por: Segal y Greenberg, 1996).

Tras producirse la asociación de Shc con el receptor Trk, Shc se convierte en un sustrato para el receptor TK. La proteína Shc fosforilada a continuación se asocia a través de su fosfotirosina con otra proteína conocida como Grb2 (Rozakis-Adcock et al., 1992, 1993), homóloga a la proteína Sem-5 de *Caenorhabditis elegans*, implicada en la transducción de señales durante el proceso de inducción vulvar del nemátodo (Clark et al., 1992; Lowenstein et al., 1992). Grb2 está integrada por un dominio SH2 flanqueado por dos dominios SH3 (SH3-SH2-SH3) (Clark et al., 1992; Lowenstein et al., 1992). En concreto, los dominios SH3 de Grb2 median su asociación con una tercera proteína, mSOS (de *son of sevenless*), que se ha identificado como el homólogo mamífero de una proteína implicada en la regulación del desarrollo ocular de la mosca de la fruta (Simon et al., 1991, 1993; Li et al., 1993; Rozakis-Adcock et al., 1993; Suen et al., 1993). Previamente a esta interacción, el receptor Trk activado fosforila la proteína mSOS inicialmente anclada en la membrana. No obstante, se desconoce hasta qué punto dicha fosforilación es relevante para la función de mSOS, pues ésta actúa como una proteína liberadora del nucleótido de guanina, convirtiendo p21ras-GDP en la forma activa p21ras-GTP. Lógicamente, hay que pensar en la posible existencia de otros factores intercambiadores además de mSOS.

3.6.2.2 p21ras

p21ras es la denominación genérica de una familia de proteínas de ~21 kDa de peso molecular con capacidad para unirse e hidrolizar moléculas de GTP durante el curso de su activación (revisado por: Wiesmüller y Wittinghofer, 1994), que en condiciones normales se asocian con la superficie citoplasmática de la membrana plasmática celular a través de una cola lipídica (Casey, 1995). La activación de las proteínas p21ras constituye un acontecimiento crítico en la diferenciación y supervivencia neuronal inducida por las NT's. Tanto el NGF como el BDNF incrementan los niveles de p21ras activado en células neuronales (Qiu y Green, 1991, 1992; Li et al., 1992; Muroya et al., 1992b; Ng y Shooter, 1993; Carter et al., 1995; Zirrgiebel et al., 1995; Zirrgiebel y Lindholm, 1996), aunque aparentemente de forma diferente (Carter et al., 1995; Zirrgiebel y Lindholm, 1996).

La introducción de formas activas de p21ras en células neuronales, ya sea mediante microinyección intracitoplasmática, microtritución (Bar-Sagi y Feramisco, 1985; Noda et al., 1985; Borasio et al., 1989, 1996; Weng et al., 1996), infección viral (Noda et al., 1985; Simpson et al., 1991) o transfección génica (Guerrero et al., 1986; Sugimoto et al., 1988; Rukenstein et al., 1991), emula el efecto promotor de la diferenciación y la supervivencia neuronal de las NT's. Por otra parte, la expresión de un mutante inhibitorio de p21ras (Szeberenyi et al., 1990, 1992; Wood et al., 1992a), así como la inyección intracitoplasmática de anticuerpos anti-p21ras (Hagag et al., 1986; Altin et al., 1991a; Kremer et al., 1991; Nobes et al., 1991; Borasio et al., 1993; Nobes y Tolkovsky, 1995) en células neuronales interfiere con las respuestas biológicas a las NT's. De hecho, en las células neuronales el NGF activa p21ras a través del receptor TrkA, produciendo un marcado aumento de la forma p21ras-GTP (Qiu y Green, 1991; Muroya et al., 1992b; Ng y Shooter, 1993). El análisis

cinético demuestra que la activación de p21ras estimulada por las NT's es mantenida, a diferencia de lo que ocurre con otros factores no neurotróficos que tan sólo producen una activación transitoria de p21ras (Gotoh et al., 1990; Muroya et al., 1992b; Qiu y Green, 1992; Traverse et al., 1992; Ng y Shooter, 1993; revisado por: Marshall, 1995).

En conjunto, todos estos resultados indican que las NT's regulan el estado de activación de p21ras. Cuando p21ras está unido a GDP, se mantiene inerte, mientras que se activa cuando interacciona con GTP. La proteína mSOS activa p21ras a través de la estimulación del intercambio de GDP por GTP (revisado por: McCormick, 1994). Sin embargo, no está claro hoy por hoy si el complejo de señalización Trk-Shc-Grb2-mSOS activado funciona únicamente para aproximar el factor mSOS intercambiador GTP-GDP a la membrana plasmática -entrando así en contacto con p21ras-, o si por contra tiene otras funciones de señalización adicionales.

3.6.2.2.1 El control de la actividad de p21ras por las GAP's y los GRF's

La actividad biológica de p21ras está aparentemente controlada por dos familias de proteínas: los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GRF's; *guanine nucleotide exchange factors*) y las proteínas activadoras de la actividad guanosina trifosfatasa (GAP; *GTPase-activating protein*). Mientras que la actividad GRF estimula el paso de p21ras-GDP a p21ras-GTP (Downward et al., 1990; Huang et al., 1990; West et al., 1990; Wolfman y Macara, 1990; Yamamoto et al., 1990), la actividad GAP -encarnada en una familia de proteínas con un peso molecular aproximado de 120 kDa- favorece la transición de p21ras-GTP a p21ras-GDP (Trahey y McCormick, 1987; Gibbs et al., 1988; McCormick, 1994). De esta forma, la activación de p21ras está sometida

a un estricto control gracias al equilibrio existente entre estas dos actividades reguladoras.

En las células neuronales, las NT's estimulan un incremento tanto de la actividad GRF como de la actividad GAP, aparentemente a través de la activación de los receptores Trk (Yatani et al., 1990; Li et al., 1992; Medema et al., 1992; Duchense et al., 1993). Recientemente se han obtenido evidencias indirectas *in vivo* de la implicación de GAP en el control estricto de la actividad p21ras, a su vez necesaria para la supervivencia neuronal y un adecuado desarrollo del SN (Henkemeyer et al., 1995; Yao y Cooper, 1995b). No obstante, no resulta del todo evidente que GAP participe en la activación de p21ras inducida por las NT's en las células neuronales (Qiu y Green, 1991; Li et al., 1992; Muroya et al., 1992; Thomas et al., 1992).

3.6.2.2 La cascada de kinasas activada por p21ras

En las células neuronales expuestas a las NT's, la forma activa de p21ras interacciona con la serina/treonina kinasa Raf, fosforilándola y activándola (Morrison et al., 1988b; Moodie et al., 1992; Williams et al., 1992b; Wood et al., 1992a; VanAelst et al., 1993; Voltek et al., 1993; Warne et al., 1993; Fabian et al., 1993, 1994; Leever et al., 1994; Marshall, 1994; Herrmann et al., 1995; Marais et al., 1995; Russell et al., 1995). De hecho, se ha demostrado la implicación de la kinasa Raf en la mediación de la señal neurotrófica (Ohmichi et al., 1992c; Troppmair et al., 1992; Oshima et al., 1993; Jaiswal et al., 1994; Traverse y Cohen, 1994).

Una vez activada, la kinasa Raf fosforila y estimula la actividad de la proteína kinasa MEK (Howe et al., 1992; Alessi et al., 1994; Jaiswal et al., 1994; Lange-Carter y Johnson, 1994; Vaillancourt et al., 1994; Moriguchi et al., 1995; Peraldi et al., 1995). Aparentemente, la activación

de MEK es necesaria y suficiente para ciertos aspectos de la diferenciación de las células neuronales (Cowley et al., 1994; Pang et al., 1995). Los únicos sustratos conocidos de MEK son las MAPK's -también llamadas ERK's- (Crews et al., 1992; Qiu y Green, 1992; Thomas et al., 1992). En células neuronales estimuladas con NT's, es posible comprobar cómo MEK cataliza la fosforilación de las MAPK's a nivel de residuos de treonina y tirosina (Payne et al., 1991), necesaria para su activación (Ray y Sturgill, 1988; Rossomando et al., 1989; Anderson et al., 1990; Gómez y Cohen, 1991; Kosako et al., 1992; Matsuda et al., 1992; Nakielny et al., 1992a, 1992b) y posterior translocación al núcleo celular (Chen et al., 1992; Nguyen et al., 1993b). En buena lógica, las NT's estimulan la fosforilación a nivel de tirosinas, activación y translocación nuclear de las MAPK's (Gotoh et al., 1990; Miyasaka et al., 1990; Sano et al., 1990; Tsao et al., 1990; Boulton et al., 1991; Schanen-King et al., 1991; Ohmichi et al., 1992c; Thomas et al., 1992; Traverse et al., 1992; Wood et al., 1992a). Asimismo, se ha demostrado *in vivo* la capacidad de las neuronas periféricas para transportar retrógradamente Raf, MEK y MAPK's (Johanson et al., 1995).

Las MAPK's son quinasas prolinea-dirigidas (Mansour et al., 1994; Marshall, 1994), de forma que fosforilan diversos factores transcripcionales (CREB, SRF, TCF, Elk-1, c-myc, c-jun, c-fos, etc.) así como otras familias de quinasas, las quinasas S6 ribosomales y la MAPKAP kinasa 2 (revisado por: Chen et al., 1993; Segal y Greenberg, 1996). Las MAPK's también influyen sobre los componentes del citoesqueleto a través de la fosforilación de MAP's a nivel de residuos de serina y treonina (Landreth et al., 1990; Miyasaka et al., 1990). Por último, las MAPK's contribuyen a la regulación de la transducción neurotrófica a través de mecanismos de *feed-back* sobre los receptores Trk y Raf (Anderson et al., 1991; Loeb et al., 1992).

3.6.3 *Las vías independientes de p21ras*

3.6.3.1 La fosfolipasa C- γ

La PLC- γ es otro de los enzimas cuya actividad enzimática es inducida por las NT's (Kim et al., 1991b; Qiu y Green, 1992; Widmer et al., 1993). La PLC- γ interacciona con el receptor TrkA activado a nivel del residuo de fosfotirosina Tyr785 (Obermeier et al., 1993a; Middlemas et al., 1994; Stephens et al., 1994). Dicha interacción resulta en la fosforilación a nivel de residuos de tirosina y serina, y la activación de la PLC- γ (Nishibe et al., 1990; Kim et al., 1991b; Ohmichi et al., 1991a, 1991c; Vetter et al., 1991; Obermeier et al., 1993a; Widmer et al., 1993). El enzima activado hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (IP4,5P), generando dos moléculas con capacidad de señalización: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP1,4,5P) (Rhee y Choi, 1992). De hecho, en células sensibles al NGF la exposición a dicha NT produce una rápida elevación de los niveles intracelulares de IP1,4,5P y DAG (Lakshmanan, 1979; Traynor et al., 1982; Contreras y Guroff, 1987; Altin y Bradshaw, 1990). El IP1,4,5P interacciona con su receptor a nivel del retículo endoplasmático y desencadena la liberación en el citoplasma del Ca^{2+} acumulado en los depósitos internos (Berninger et al., 1993). El DAG estimula la PKC, ya sea por sí solo o en combinación con Ca^{2+} (Berridge, 1993).

La activación de la PLC- γ , mediada por los receptores Trk activados, está íntimamente relacionada con la actividad neuritogénica de las NT's (Lamballe et al., 1993; Obermeier et al., 1994; Stephens et al., 1994). La inducción por las NT's de la actividad de la PLC- γ es un mecanismo alternativo para la activación de p21ras, dado el importante grado de complementación existente entre la vía de la PLC- γ y la cascada de señales iniciada a través de Shc a la hora de mediar los efectos

promotores de la diferenciación neuronal de las NT's (Obermeier et al., 1994; Stephens et al., 1994). Sin embargo, aún no está claro cómo la activación de la PKC y la movilización de Ca^{2+} intracelular que resultan de la estimulación de la PLC- γ , pueden conducir a la activación de la vía p21ras-MAPK en las células neuronales estimuladas por NT's.

3.6.3.2 La fosfatidilinositol-3 kinasa

La activación de los receptores Trk por sus respectivos ligandos se sigue de su asociación con la PI-3K, que a continuación resulta activada (Ohmichi et al., 1991a; Carter y Downes, 1992; Ohmichi et al., 1992b; Raffioni y Bradshaw, 1992; Soltoff et al., 1992). Existe una cierta controversia sobre la capacidad de la PI-3K para interactuar directa o indirectamente con los receptores Trk (Backer et al., 1992; Ohmichi et al., 1992b; Soltoff et al., 1992; Carpenter et al., 1993; Obermeier et al., 1993b; Shoelson et al., 1993; Kodaki et al., 1994; Rodríguez-Viciano et al., 1994; Wang et al., 1995a), aunque sí parece claro que las NT's inducen la actividad de este enzima mediante su fosforilación a nivel de residuos de tirosina (Ohmichi et al., 1992b; Raffioni y Bradshaw, 1992; Soltoff et al., 1992) y su posterior translocación al compartimento nuclear (Neri et al., 1994).

En los últimos años se ha demostrado la participación de la PI-3K en la mediación de la supervivencia neuronal en respuesta a las NT's (Yao y Cooper, 1995a; Miller et al., 1997). Por otra parte, algunos investigadores han demostrado que la activación de la PI-3K podría no ser necesaria para la neuritogénesis (Obermeier et al., 1994; Stephens et al., 1994), aunque otros han sugerido lo contrario (Kimura et al., 1994) así como la posibilidad de que la PI-3K participe en la regulación del citoesqueleto y del tráfico de vesículas membranas (Schu et al., 1993; Stack et al., 1993; Cheatham et al., 1994; Chung et al., 1994), incluyendo

la internalización de receptores (Joly et al., 1994, 1995) y el transporte de glucosa (Okada et al., 1994).

La PI-3K es un heterodímero compuesto de una subunidad reguladora de 85 kDa con dominios SH2 en su estructura, y de una subunidad catalítica de 110 kDa (Carpenter et al., 1990; Escobedo et al., 1991; Otsu et al., 1991; Skolnik et al., 1991). La fosforilación activadora de la PI-3K se produce a nivel de p85 (Raffioni y Bradshaw, 1992; Soltoff et al., 1992), aunque existen algunos datos que sugieren que p110 también podría ser fosforilada (Ohmichi et al., 1992b; Raffioni y Bradshaw, 1992). La PI-3K activada puede fosforilar en la posición 3' el fosfatidilinositol (IP), el fosfatidilinositol 4-fosfato (IP4P) y el IP4,5P (Carpenter y Cantley, 1990), así como residuos de serina en substratos proteicos (Auger et al., 1989). Los substratos proteicos de la PI-3K mejor caracterizados son su propia subunidad reguladora p85 y el substrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1) (Carpenter et al., 1990; Dhand et al., 1994; Lam et al., 1994a).

Los lípidos fosforilados en posición 3' por la PI-3K estimulan la kinasa Akt (también conocida como proteína kinasa B) (Burgering y Coffey, 1995; Kohn et al., 1995; Franke et al., 1995, 1997a; Andjelkovic et al., 1996; Park et al., 1996a; Klippel et al., 1996, 1997), aparentemente implicada en la regulación de la supervivencia neuronal (Yao y Cooper, 1995a, 1996; Dudek et al., 1997; Franke et al., 1997b; Kennedy et al., 1997). A su vez, la activación de la kinasa Akt comporta la estimulación de la kinasa S6 denominada pp90Rsk (Burgering y Coffey, 1995). De hecho, se ha correlacionado la activación de la PI-3K con la de pp90Rsk (Cheatham et al., 1994; Chung et al., 1994; Ming et al., 1994; Klippel et al., 1996). Asimismo, ciertas isoformas de PKC pueden ser activadas por los metabolitos del IP (Nakanishi et al., 1993; Toker et al., 1994).

En los últimos años se ha relacionado la PI-3K con la vía de señalización p21ras-MAPK (Kodaki et al., 1994; Rodríguez-Viciano et al., 1994; Hu et al., 1995). En su forma activa, p21ras puede interactuar y asociarse directamente con la PI-3K, activándola y estimulando la producción de lípidos 3'-fosforilados (Rodríguez-Viciano et al., 1994). A su vez, la PI-3K es capaz de inducir una acumulación de la forma activa de p21ras (Hu et al., 1995). El ácido fosfatídico, el ácido araquidónico, el IP, el IP4P y el IP4,5P son capaces de inhibir la actividad de GAP (Bollag y McCormick, 1991), favoreciendo indirectamente un incremento de la actividad de p21ras. Otro punto de conexión entre la PI-3K y la vía p21ras-MAPK parece situarse a nivel de la kinasa JNK (de kinasa N-terminal de c-Jun), cuya activación comporta un incremento de la expresión de *c-jun* y *c-fos* (Gille et al., 1995; Whitmarsh et al., 1995). La PI-3K activada estimula la actividad de la kinasa JNK, aparentemente a través de p21ras (Klippel et al., 1996). Por último, recientemente se ha descrito otra conexión entre la PI-3K y la activación de las MAPK's a través de una(s) kinasa(s) de identidad aún desconocida (López-Illasaca et al., 1997). Sin embargo, en general se desconoce en qué medida estos mecanismos contribuyen a la señalización a través de la PI-3K de la respuesta de supervivencia neuronal.

3.6.3.3 La proteína SNT

La proteína SNT (*suc-associated neurotrophic factor-induced tyrosine-phosphorylated target*) tiene un papel central en lo que aparentemente parece otra nueva vía de transducción de señales activada por las NT's. Se trata de una proteína de 78-90 kDa de peso molecular cuya fosforilación a nivel de residuos de tirosina puede ser inducida por las NT's de una forma Trk-dependiente y p21ras-independiente (Rabin et al., 1993; Peng et al., 1995). Una vez fosforilada, la proteína SNT se transloca al núcleo de las neuronas, donde se cree

que podría actuar como un factor transcripcional de genes que controlan la salida del ciclo celular (Rabin et al., 1993).

A diferencia de las vías de transducción anteriormente analizadas, la activación de la proteína SNT no parece depender de la fosforilación a nivel de residuos de tirosina del propio receptor Trk. La delección de una secuencia conservada carente de residuos de tirosina a nivel yuxtamembranario en los receptores Trk elimina la activación de la proteína SNT, sin afectar la capacidad del receptor Trk para activar p21ras, la PLC- γ o la PI-3K (Stephens et al., 1994; Peng et al., 1995). No obstante, cabe la posibilidad de que existan interconexiones entre las diferentes vías de transducción, como sugiere la demostración de que la proteína SNT es capaz de interactuar con el dominio SH2 de Grb2 (Ong et al., 1996).

3.6.3.4 La proteína kinasa C

La PKC es otro de los enzimas citoplasmáticos que se activan en relación con la acción de las NT's (Crémins et al., 1986; Hama et al., 1986; Heasley y Johnson, 1989; Damon et al., 1990; Kondratyev et al., 1990; Clark y Lee, 1991; Herman et al., 1991; Ohmichi et al., 1993b; Zirrgiebel et al., 1995). Las PKC's son una familia de proteína kinasas Ca^{2+} -/fosfolípido-dependientes, con actividad fosforilativa a nivel de residuos de serina/treonina, que están implicadas en la regulación del crecimiento celular y las funciones de diferenciación de múltiples tipos celulares.

En la actualidad se han identificado hasta doce isoformas, que difieren tanto en su especificidad de sustratos como en su dependencia de la disponibilidad de Ca^{2+} . Se clasifican en tres grupos diferentes:

convencionales (α , β_1 , β_2 y γ), noveles (δ , ϵ , η y θ) y atípicas (ζ , ψ , μ y λ) (Nishizuka, 1988; Hug y Sarre, 1993). De todas estas isoformas, las α , β -especialmente la β_2 - y γ son particularmente abundantes en el tejido nervioso y las células neuronales, aunque también es posible detectar las isoformas δ , ϵ y ζ (Brandt et al., 1987; Huang et al., 1987a, 1987b, 1988; Nishizuka, 1988; Saito et al., 1989; Wada et al., 1989; Koda et al., 1991; Wooten et al., 1992; Leli et al., 1993; Ford et al., 1995; Rosenberger et al., 1995; Boyce et al., 1996). Mientras que las PKC's convencionales requieren Ca^{2+} , fosfolípidos y DAG, las isoformas noveles sólo necesitan fosfolípidos y DAG, y las atípicas ni calcio ni DAG ni fosfolípidos. Presumiblemente, la elevación del Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la producción de DAG necesarias para la activación de la PKC depende de la activación de la PLC- γ (Contreras y Guroff, 1987; Altin y Bradshaw, 1990; Fink y Guroff, 1990). Por otra parte, la activación de la actividad PKC depende no sólo de la presencia de activadores lipídicos, sino también de su fosforilación y, aparentemente, de su translocación del citosol a la membrana celular.

La PKC ha sido implicada tanto en la diferenciación como en la supervivencia neuronal estimulada por las NT's. Los agonistas de la PKC estimulan la supervivencia neuronal (Ishii, 1978; Hsu, 1985; Montz et al., 1985; Wakade et al., 1988; Bhave et al., 1990; Herman et al., 1991; Batistatou y Greene, 1993; Zirrgiebel et al., 1995) así como la diferenciación morfológica y funcional de las células neuronales (Spinelli et al., 1982; Hsu, 1985; Montz et al., 1985; Bixby, 1989; Hsu, 1989; Hsu et al., 1989; Pahlman et al., 1990; Herman et al., 1991; Heikkila et al., 1993), mientras que los antagonistas de la PKC la inhiben (Hall et al., 1988; Fagerstrom et al., 1996). No obstante, existen trabajos contradictorios que sugieren que la activación de la PKC *per se* no es suficiente para estimular el crecimiento neurítico ni para mantener la viabilidad neuronal (Rydel y Greene, 1988; Rukenstein et al., 1991). Asimismo, resulta obvio que la

PKC no está implicada en la mediación de todos los efectos de las NT's (Aletta et al., 1988; Reinhold y Neet, 1989; Rowland-Gagné y Greene, 1990).

Hasta la fecha, se desconoce con precisión cómo interviene la PKC en la mediación de la acción biológica de las NT's. La PKC puede activar directamente tanto *in vitro* como *in vivo* la kinasa Raf-1 (Morrison et al., 1988b; Rossomando et al., 1989; Sozeri et al., 1992; Kolch et al., 1993) y, presumiblemente a través de ésta, las MAPK's (Chung et al., 1991a) y las kinasas S6 (Matsuda y Guroff, 1987; Chen et al., 1991). La PKC también podría canalizar una vía de activación de p21ras (Yu et al., 1988; Thomas et al., 1992; Wood et al., 1992a). Downward et al. (1990) han establecido una conexión muy interesante entre la PKC y p21ras en células linfoides, al demostrar que la activación de la PKC estimula indirectamente el paso de p21ras-GDP a p21ras-GTP a través de la inhibición de una actividad GAP. Por otra parte, en determinadas situaciones p21ras es capaz de estimular la actividad de la PKC (Lacal et al., 1987; Morris et al., 1989; Fukumoto et al., 1990; Gauthier-Rouvière et al., 1990; Szeberenyi et al., 1992). La PKC también estimula de forma directa e indirecta la actividad adenilato ciclasa (Bell et al., 1985; Choi et al., 1993; Jacobowitz et al., 1993; Yoshimura y Cooper, 1993).

En los últimos años se han identificado diversos substratos de la PKC, aunque aún no se les ha podido asignar una función clara. Entre las probables dianas de la PKC se incluye el factor transcripcional AP-1 compuesto por dímeros Fos-Jun (Curran y Morgan, 1985; Greenberg et al., 1985; Kruijer et al., 1985; Milbrandt, 1986; Sassone-Corsi et al., 1989; Boyle et al., 1991); la subunidad inhibidora de NFκB (IκB), cuya fosforilación libera el factor transcripcional NFκB y permite su migración al núcleo (Gosh y Baltimore, 1990); las ADN topoisomerasas I y II (Pommier et al., 1990; de Vore et al., 1992; Samuels y Shimizu, 1992), y; diversas

proteínas adicionales entre las que destacan la miogenina, la neuromodulina, el MARCKS (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*), la lamina B y la glicoproteína P (Andreasen et al., 1983; Skene, 1990; Coggins y Zwiers, 1991; Gispen et al., 1991; Aderem, 1992a, 1992b; Li y Aderem, 1992; Blackshear, 1993; Hinrichsen y Blackshear, 1993; Sawai et al., 1993).

3.6.3.5 La proteína kinasa N

La PKN es una proteína de 45-47 kDa de peso molecular (Volonté y Greene, 1992a), cuya actividad kinasa es rápidamente activada por el NGF en las células neuronales (Blenis y Erikson, 1986; Rowland et al., 1987; Volonté et al., 1989). La inhibición de la PKN bloquea la regeneración neurítica y la actividad ornitina decarboxilasa inducida por NGF (Volonté et al., 1989; Greene et al., 1990), aunque no parece estar implicada de forma significativa en la mediación de la supervivencia neuronal (Greene et al., 1990). La activación de la PKN pasa por la interacción con el receptor TrkA activado (Volonté et al., 1993b), pudiendo ser inhibida selectivamente por análogos de las purinas, como la 2-aminopurina (2-AP), la 6-tioguanina (6-TG) o el ribósido de 6-metilmercaptipurina (Volonté et al., 1989; Volonté y Greene, 1990b, 1992b).

In vitro, la PKN es capaz de actuar sobre histonas, la tirosina hidroxilasa, la proteína básica de mielina, la sinapsina, c-Fos, c-Jun y las kinasas S6 (Blenis y Erikson, 1986; Rowland et al., 1987; Volonté y Greene, 1992a). La acción fisiológica de la PKN en la señalización de los efectos biológicos del NGF -y presumiblemente de las otras NT's- queda evidenciada por el hecho de que los análogos de las purinas con actividad inhibidora de la PKN también bloquean algunas, aunque no todas, de las acciones biológicas del NGF (Volonté et al., 1989; Greene et

al., 1990; Volonté y Greene, 1990a, 1992a, 1992b; Batistatou et al., 1992).

3.6.3.6 La proteína kinasa A y el cAMP

La implicación de cAMP y de las PKA's en la transducción de señales de las NT's es aún hoy día objeto de una gran controversia. En un principio, se pensó que el cAMP era un segundo mensajero implicado en la mediación de los efectos biológicos de las NT's a través de la activación de PKA's (Richter-Landsberg y Jastorff, 1986). De acuerdo con esta hipótesis, se ha documentado en determinadas células neuronales la capacidad de las NT's para estimular la activación de la PKA (Crémis et al., 1986) y, en algunos casos concretos, un incremento de los niveles de cAMP (Nikodijevic et al., 1975; Schubert y Whitlock, 1977; Schubert et al., 1978; Skaper et al., 1979). Asimismo, la forskolina -un activador de la adenilato ciclasa- y análogos permeables del cAMP emulan el efecto promotor de la supervivencia y la diferenciación neuronales de las NT's (Frazier et al., 1973; Haleboua y Patrick, 1980; Yu et al., 1980; Gunning et al., 1981a; Heidemann et al., 1985; Richter-Landsberg y Jastorff, 1986; Rydel y Greene, 1988; Edwards et al., 1991; Rukenstein et al., 1991; Deckwerth y Johnson, 1993; Howard et al., 1993; Pittman et al., 1993; Nakamura et al., 1994; Michel et al., 1995; Yao et al., 1995). Algunos de los efectos biológicos del NGF (Kalman et al., 1990; Ginty et al., 1992a) parecen depender de la activación de la PKA y no de p21ras.

Sin embargo, existen múltiples evidencias que cuestionan el protagonismo del cAMP como segundo mensajero de las NT's. En diversos tipos neuronales las NT's no inducen un incremento de los niveles de cAMP (Frazier et al., 1973; Hatanaka et al., 1978; Lakshmanan, 1978; Race y Wagner, 1985; Berg et al., 1995), ni el cAMP es capaz de mediar las acciones de las NT's (Gunning et al., 1981a, 1981b; Heidemann et al., 1985; Crémis et al., 1986; Richter-Landsberg y

Jastorff, 1986; Leonard et al., 1987; Cho et al., 1989; Damon et al., 1990). En células PC12 carentes de actividad PKA, la neuritogénesis y otros acontecimientos a nivel molecular en respuesta al NGF acontecen normalmente (Machida et al., 1991).

El pensamiento actual es que, si bien el cAMP no es un mediador directo de los efectos de las NT's, probablemente actúa modulando la acción promotora de diferenciación de diversos factores tróficos, incluyendo las NT's. Por ejemplo, se ha comprobado cómo los efectos del NGF y del cAMP sobre la diferenciación son sinérgicos (Gunning et al., 1981a, 1981b; Heidemann et al., 1985; Richter-Landsberg y Jastorff, 1986). Dicha potenciación podría deberse a la capacidad del NGF para amplificar la producción de cAMP en células neuronales en respuesta a otros estímulos (Race y Wagner, 1985; Berg et al., 1995), probablemente a través de la activación de la PKC (Berg et al., 1994, 1995). También se ha documentado recientemente cómo el cAMP puede modular la acción del EGF sobre las células neuronales, transformándolo en un factor de diferenciación (Yao et al., 1995). Aunque el cAMP estimula la activación de las MAPK's en células neuronales (Frödin et al., 1994; Young et al., 1994; Erhardt et al., 1995; Yao et al., 1995; Vossler et al., 1997), estudios recientes sugieren que la actividad PKA regula negativamente la cascada Raf-MAPK (Cook y McCormick, 1993; Graves et al., 1993; Sevetson et al., 1993; Wu et al., 1993; Chuang et al., 1994; Frödin et al., 1994; Erhardt et al., 1995; Peraldi et al., 1995).

3.7 La transducción de señales mediada por el receptor p75

El receptor p75 posee la capacidad de señalizar por sí mismo. La activación de su dominio citoplasmático, mediada por la interacción del

receptor con sus correspondientes ligandos, es suficiente para iniciar ciertas respuestas biológicas (revisado en Apartado 3.3.2). Aunque no hay datos claros e inequívocos sobre las vías de transducción iniciadas a partir de la activación de p75, en los últimos años se han sugerido diversas posibilidades. A pesar de que p75 no posee actividad TK *per se* (Johnson et al., 1986a; Radeke et al., 1987), su participación parece ser necesaria, aunque no suficiente, para que las NT's desencadenen la correspondiente cascada de fosforilaciones a nivel de tirosinas de múltiples substratos citoplasmáticos (Berg et al., 1991; Verdi et al., 1994a).

Se han identificado actividades proteína kinasa asociadas a p75 (Ohmichi et al., 1991b; Volonté et al., 1993a; Canossa et al., 1996). Asimismo, es posible identificar una secuencia mastoparanoide de unión a proteínas G en el extremo carboxi-terminal de p75 (Feinstein y Larhammer, 1990). Alternativamente, p75 podría señalar a través de la vía del glicosil-fosfatidilinositol/inositol fosfoglicano (Represa et al., 1991). Las NT's, a través de interacción con el receptor p75, aparentemente regulan la hidrólisis de moléculas de glicosil-fosfatidilinositol ancladas en la membrana. Como resultado, se produce una rápida acumulación intracelular de un metabolito, el inositol fosfoglicano (IPG), que a su vez es capaz de reproducir algunos de los efectos de las NT's (Represa et al., 1991; Varela-Nieto et al., 1991).

En el extremo carboxi-terminal de p75 se ha identificado un "dominio de muerte" (Boldin et al., 1995; Chapman, 1995), homólogo al que está presente en la porción citoplasmática del receptor del TNF α (Brakebusch et al., 1992; Itoh y Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993; Chapman, 1995). En el caso del receptor del TNF α , su activación conduce rápidamente a la muerte celular a través de la activación de proteasas de la familia ICE (enzima conversor de la interleukina 1 β)

(revisado en Apartado 6.6.3). Por otra parte, la interacción entre el NGF y el receptor p75 resulta en la producción de ceramida a través de la activación del ciclo de la esfingomielinasa (Dobrowsky et al., 1994, 1995). La ceramida es un mensajero intracelular implicado en la señalización de la muerte celular apoptótica, aparentemente a través de la activación de una cascada de proteína kinasas y del factor transcripcional NFκB (revisado en Apartado 6.5.3), cuya actividad aumenta en relación con la interacción entre p75 y la NT (Carter et al., 1996) y *vice versa* (Tagliatela et al., 1997).

3.8 La duración de la señal como un mecanismo adicional de transducción de señales

La duración de la señalización ha sido identificada como un mecanismo adicional por el cual los transductores de señales pueden especificar la diferenciación (revisado por: Marshall, 1995). A diferencia de lo que ocurre con otros factores de crecimiento (p.ej., el EGF o el FGF), las NT's inducen una activación mantenida y no transitoria de los mecanismos de transducción a nivel intracelular. Esta observación no es del todo sorprendente, dado que en condiciones fisiológicas las células neuronales están expuestas de forma crónica a las NT's a las que son sensibles. La fosforilación de los receptores Trk inducida por las NT's puede ser observada incluso dos días después del tratamiento de las células neuronales (Kaplan et al., 1991b; Yamada et al., 1994), existiendo una buena correlación entre la fosforilación sostenida de los receptores Trk por la unión de sus correspondientes NT's y la respuesta de diferenciación neuronal (Yamada et al., 1994).

La fosforilación a nivel de tirosinas mantenida mediante la aplicación de ortovanadato sódico -un inhibidor de tirosina fosfatasa- estimula el crecimiento neurítico en las células neuronales (Rogers et al., 1994). Asimismo, el tratamiento de las células PC12 con NGF conducente

a la diferenciación neuronal resulta en una elevación sostenida de la actividad de p21ras (Muroya et al., 1992a) y de la actividad y fosforilación a nivel de residuos de tirosina de las MAPK's y las kinasas S6 (Gotoh et al., 1990; Qiu y Green, 1991, 1992; Thomas et al., 1992; Traverse et al., 1992; Wood et al., 1992a; Nguyen et al., 1993b). Las NT's también inducen una fosforilación y activación de la proteína SNT (Rabin et al., 1993), de la PLC- γ (Qiu y Green, 1992; Blumberg et al., 1995) y de la PI-3K (Blumberg et al., 1995) mantenidas durante varias horas tras el inicio de la estimulación neurotrófica. De acuerdo con esta hipótesis, la sobreexpresión de Raf (Wood et al., 1993) y de MEK (Cowley et al., 1994) induce el crecimiento neurítico en las células PC12.

3.9 El receptor del GDNF

El receptor del GDNF, actualmente denominado GDNFR α , es una glicoproteína anclada a la superficie celular a través de un puente glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) y carece de un dominio citoplasmático con capacidad de transducir *per se* (Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996). Mediante estudios de *crosslinking*, se ha podido comprobar cómo el complejo formado por el GDNF y el GDNFR α interacciona con el protooncogén Ret, que se fosforila a continuación (Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996; Trupp et al., 1996). Ret codifica un receptor transmembranario con actividad TK (Takahashi y Cooper, 1987; Iwamoto et al., 1993) y con capacidad para interactuar con Shc (Arighi et al., 1997).

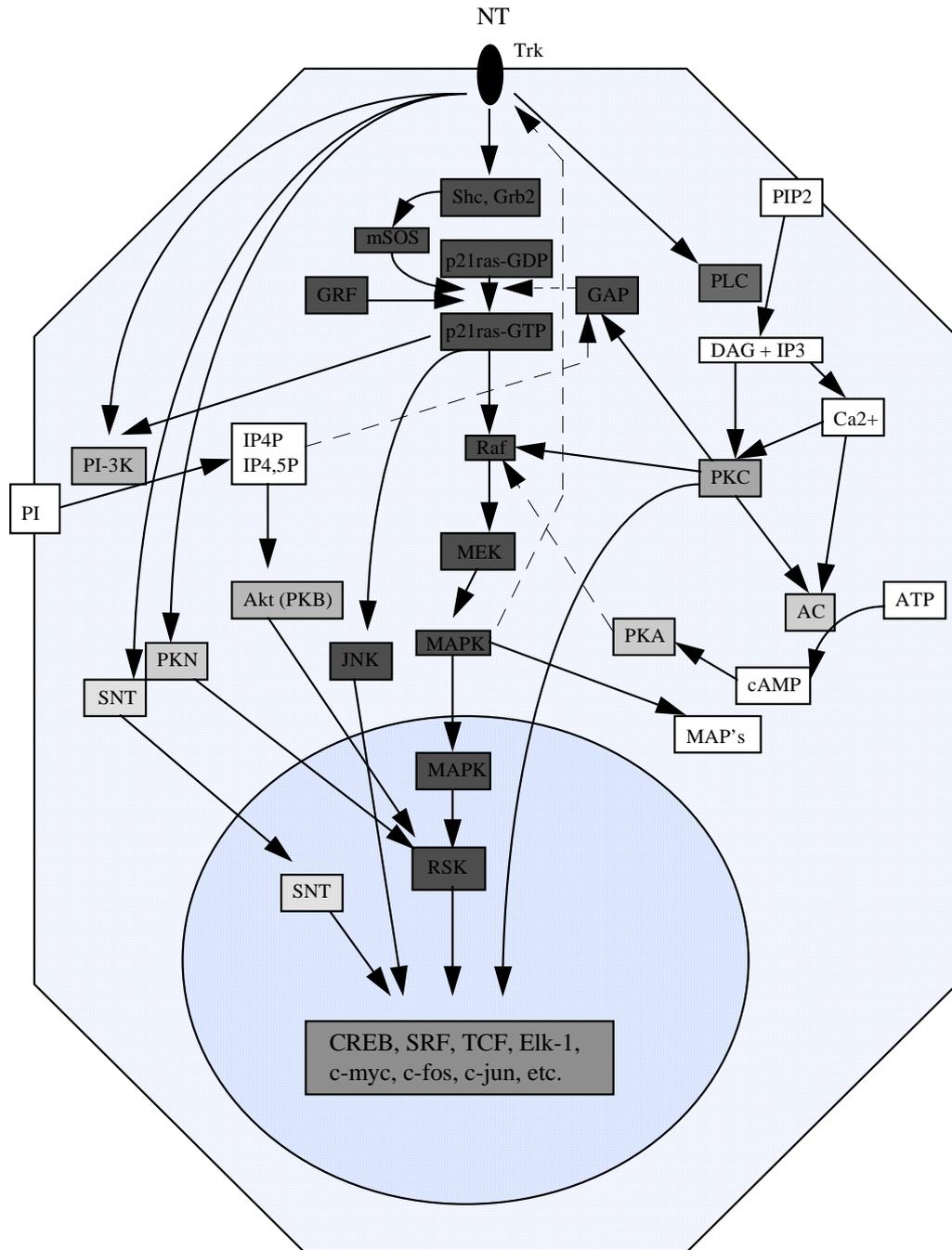


Figura 3.4. Vías de transducción implicadas en la señalización neurotrófica a través de los receptores Trk.

Las evidencias de que se dispone en la actualidad apuntan a que Ret es el encargado de señalizar los efectos biológicos del GDNF (Durbec et al., 1996b; Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996; Trupp et al., 1996). De hecho, se han generado animales deficitarios en la expresión de Ret

(Schuchardt et al., 1994, 1996; Durbec et al., 1996a), que muestran un fenotipo muy similar al de los animales carentes de GDNF (Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sánchez et al., 1996). Si bien existe un conocimiento muy limitado sobre el patrón de expresión del GDNFR α (Treanor et al., 1996), la expresión del ARNm para Ret ha sido ampliamente caracterizada (Pachnis et al., 1993; Robertson y Mason, 1995; Schuchardt et al., 1995; Tsusuki et al., 1995). El ARNm para Ret y GDNFR α está presente en muchos tipos neuronales, tanto del SNP como del SNC, incluyendo las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, las neuronas simpáticas, las MTN's y una subpoblación de neuronas sensoriales (Miyazaki et al., 1993; Pachnis et al., 1993; Robertson y Mason, 1995; Schuchardt et al., 1995; Tsusuki et al., 1995; Treanor et al., 1996).

3.10 Los receptores del CNTF y del LIF

El CNTF y el CDF/LIF forman parte de una familia de citocinas con similitud estructural entre sí y con acciones biológicas sobre células neuronales y hemopoyéticas, en la que también se incluyen la oncostatina M, la interleukina 3, la interleukina 5, la IL-6, el G-CSF y el GM-CSF (revisado por: Bazan, 1991; Davis et al., 1991).

De forma paralela, se ha definido un sistema receptor común para todos estos factores y citocinas emparentados con el CNTF y el CDF/LIF (Ip et al., 1992b). En general, estos receptores incorporan en su estructura varias subunidades α y β . Las subunidades α , que determinan la especificidad de la interacción entre ligando y receptor, cuentan con una estructura peculiar; carecen de dominios transmembranario y citoplasmático, estando ancladas a la superficie celular a través de un puente GPI (revisado por: Davis y Yancopoulos, 1993). Como no poseen capacidad para señalar *per se*, las subunidades α deben interaccionar

con las subunidades β , que sí cuentan con capacidad para transducir señales intracelulares. En concreto, se han caracterizado dos tipos de subunidad β : LIFR β y gp130. Mientras que sólo algunos receptores cuentan con una subunidad α , todos ellos presentan subunidades β , ya sea un homodímero de gp130 o la asociación de LIFR β y gp130. Por ejemplo, el receptor de la IL-6 está integrado por una subunidad LIFR α y un dímero de gp130 (Hibi et al., 1990; Kishimoto et al., 1992), mientras que los receptores del CDF/LIF y del CNTF (CNTFR) están constituidos por la asociación de los componentes LIFR β y gp130 y, en el caso específico del CNTFR, una subunidad CNTFR α (Davis et al., 1991; Ip y Yancopoulos, 1993; Ip et al., 1992b, 1993b; Huber et al., 1993; Stahl et al., 1993, 1994). Por consiguiente, las células sensibles al LIF pueden hacerse sensibles al CNTF al coexpresar la subunidad CNTFR α (Ip et al., 1993b).

Como corresponde a la capacidad del CNTFR α para determinar la especificidad de interacción del complejo receptor con el CNTF, los transcritos de ARNm para esta subunidad se expresan sólo en células sensibles al CNTF en el SN y el tejido muscular esquelético, desde los estadios precoces del desarrollo embrionario hasta la edad adulta (Davis et al., 1991; Ip et al., 1993b; Kirsch y Hofmann, 1994; MacLennan et al., 1994). Los niveles de expresión de ARNm para CNTFR α son particularmente elevados en las MTN's espinales y del núcleo facial, las células piramidales del hipocampo, las neuronas del núcleo dentado y algunas neuronas del neocórtex (Ip et al., 1993b, 1995; MacLennan et al., 1996; Lee et al., 1997). Interesantemente, la delección del gen del CNTFR α produce un fenotipo con déficits neuronales severos (DeChiara et al., 1995) mucho más acusados que los observados en relación con la delección del CNTF (Masu et al., 1993), lo que supone una evidencia sólida de que el receptor del CNTF reconoce un ligando alternativo.

Por otra parte, recientemente se ha aislado la subunidad α del receptor de la GPA (GPAR α), implicada en la mediación de los efectos del GPA, molécula análoga del CNTF (Heller et al., 1995; Ip et al., 1995). El GPAR α , como el CNTFR α con el que comparte un 70% de homología, se expresa fundamentalmente en el SN, incluyendo todos aquellos tipos neuronales sensibles al GPA o al CNTF (Heller et al., 1995; Ip et al., 1995).

El CNTF y el CDF/LIF, como los restantes miembros de la superfamilia de las citocinas, inducen la fosforilación de diversas proteínas citoplasmáticas (Lord et al., 1991; Nakajima y Wall, 1991; Ip et al., 1992b; Schieven et al., 1992). En el caso concreto del CNTFR, las tres subunidades CNTFR α , LIFR β y gp130 se encuentran inicialmente disociadas sobre la superficie celular. Tras formarse el complejo CNTF-CNTFR α , se suman la subunidad gp130, primero, y el LIFR β , después. La heterodimerización de las subunidades β comporta la activación de una familia de TK's citoplasmáticas, conocidas como kinasas Jak/Tyk (Stahl et al., 1994; Khan et al., 1997). Estas kinasas (Jak1, Jak2 y Tyk2) son responsables de una serie de fosforilaciones en cadena a nivel de residuos de tirosina que, en última instancia, producen cambios en la expresión génica (Lord et al., 1991; Nakajima y Wall, 1991; Davis et al., 1991, 1993a, 1993b; Schieven et al., 1992; Ip et al., 1992b, 1993b; Baumann et al., 1993; Bonni et al., 1993; Huber et al., 1993; Ip y Yancopoulos, 1993; Stahl et al., 1993, 1995; Boulton et al., 1994; Darnell et al., 1994; Lutticken et al., 1994; Stahl y Yancopoulos, 1994). Por otra parte, tanto el CNTF como el CDF/LIF son capaces de aumentar los niveles de p21ras activado en las células neuronales sensibles (Schwarzschild et al., 1994). También se ha sugerido la participación de la PKC (Kalberg et al., 1993; Johnson y Nathanson, 1994) en la transducción de señales del CNTF y del CDF/LIF.

La subunidad CNTFR α participa en algunos mecanismos reguladores de la respuesta celular al CNTF. Por ejemplo, se ha demostrado que el CNTFR α puede ser liberado de la superficie celular a través de la hidrólisis del puente de unión GPI. Este CNTFR α libre podría facilitar la adquisición de la capacidad de responder funcionalmente al CNTF en células que sólo expresan en su superficie las subunidades LIFR β y gp130, aunque no CNTFR α , incluso en lugares distantes del de síntesis del CNTFR α (Davis et al., 1991, 1993a; Ip et al., 1993b). Por otra parte, el CNTFR α libre podría funcionar como un antagonista al captar CNTF presente en el medio extracelular y, por tanto, imposibilitar su interacción con receptores situados en la membrana de las células nerviosas (Fanslow et al., 1990; Davis et al., 1993a).

4. LA TEORÍA NEUROTRÓFICA DEL SIGLO XXI: NUEVOS CONCEPTOS Y ASPECTOS FISIOLÓGICOS

La Teoría Neurotrófica no ha permanecido impasible al paso de los años. Desde siempre, uno de sus principales atractivos fue la simplicidad con la que abordaba el problema de la dependencia de las neuronas de agentes neurotróficos específicos durante el desarrollo embrionario (revisado en Apartado 2.1). Sin embargo, con el tiempo se ha comprobado que el marco teórico necesario para explicar la regulación de las poblaciones neuronales embrionarias por agentes neurotróficos específicos debe ser mucho más complejo. En este sentido, hay que destacar el protagonismo que ha tenido en los últimos años el desarrollo y aplicación a la Neurobiología de las técnicas de Biología Molecular, en especial las de delección y sobreexpresión génica que han permitido por primera vez una aproximación a la implicación fisiológica de los diferentes factores neurotróficos y sus receptores. A continuación, revisaremos los principales avances que han acontecido en el área del Neurotrofismo, prestando especial atención a los estudios de delección génica por el gran avance conceptual que han supuesto.

4.1 Las neurotrofinas y su funciones fisiológicas: los experimentos de delección génica

A lo largo de los últimos 30 años, se ha acumulado una ingente cantidad de estudios *in vivo* e *in vitro*, en los que se han examinado los efectos de un aporte exógeno de NT's sobre una población neuronal en particular, así como el patrón de expresión génica de las NT's y sus receptores. De esta forma se ha conseguido establecer cómo las NT's pueden actuar sobre grupos de neuronas bien definidos en algunos casos

o sobre poblaciones neuronales que solapan sus requerimientos neurotróficos (revisado en Capítulo 2).

Sin embargo, el hecho de que una determinada NT pueda producir acciones biológicas en una población neuronal concreta *in vitro* o cuando se suministra exógenamente *in vivo*, no implica necesariamente que dicha respuesta sea relevante a nivel fisiológico. Mediante las estrategias basadas, inicialmente, en el empleo de anticuerpos anti-NT y, en etapas más recientes, la utilización de la tecnología de la recombinación homóloga para generar ratones con deleciones homocigotas de los alelos (*knockouts*) de una determinada NT y/o su correspondiente receptor Trk, se ha podido obtener en los últimos años información mucho más concluyente sobre la implicación fisiológica de las diferentes NT's en el desarrollo de poblaciones neuronales específicas (Tabla 4.1).

Fenotipos de los ratones mutantes (-/-) para neurotrofinas y receptores Trk			
<u>Mutación</u>	<u>Comportamiento</u>	<u>SNP (% pérdida neuronal)</u>	<u>SNC (inmunohistoquímica y % de pérdida neuronal)</u>
<u>NGF</u> y <u>TrkA</u>	Pérdida de nocicepción; La mayoría mueren en un plazo de 3 semanas	Ganglio Cervical Superior, 99% Ganglios Espinales, 70-80% Ganglio Nodoso, 0% Ganglio Trigémino, 70%	Motoneuronas, 0% Núcleos de la base encefálica: atrofia neuronal, < actividad colina acetiltransferasa, menor ramificación axonal.
<u>BDNF</u> y <u>TrkB</u>	Dificultad para amamantarse; La mayoría mueren en 48 h; Los animales BDNF (-/-) presentan movimientos anómalos de la cabeza en la 2ª semana	Ganglio Cervical Superior, 0% Ganglios Espinales, 30-50% Ganglio Vestibular, >80% Ganglio Nodoso, 45-65% Ganglio Trigémino, 25-55%	Motoneuronas TrkB, 35% BDNF, 0% Vmes, 40-50% Córtex, < parvalbúmina, <NPY
<u>NT-3</u> y <u>TrkC</u>	Pseudoatetosis; Pérdida de propiocepción; Algunos sobreviven 1 mes	Ganglio Cervical Superior, NT-3, 55% Ganglios Espinales TrkC, 20% NT-3, 55% Ganglio Nodoso, 50% Ganglio Trigémino, 65% (NT-3)	Motoneuronas TrkC, 30% NT-3, 0% Núcleo mesencefálico del Vº par craneal, 50% Córtex, no analizado

Tabla 4.1. Características de los ratones *knockout* para las diferentes NT's y receptores Trk. Los porcentajes expresan la pérdida de neuronas en los animales mutantes en comparación con los animales control (adaptado de: Snider, 1994).

La información obtenida hasta la fecha se irá completando a medida que se disponga de dobles mutantes y con la realización de experimentos *in vitro* con neuronas primarias que carezcan de receptores Trk. Asimismo, será necesario generar alelos hipomórficos para superar algunas de las limitaciones presentes, tales como la corta expectativa de vida de los animales. Por ejemplo, un alelo que comporte una pérdida de función parcial del gen TrkB podría llevar a la generación de animales con una mayor expectativa de supervivencia, permitiendo el estudio de estructuras más maduras. Por último, los estudios futuros deberán tener en cuenta la existencia de diferentes isoformas de los distintos miembros de la familia de receptores Trk.

4.1.1 *Los knockouts de NGF y TrkA: análisis de la función fisiológica del NGF*

Los animales sin expresión de NGF y/o TrkA (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994) presentan un fenotipo muy característico y, al mismo tiempo, predecible en base a los estudios iniciales que describían las acciones *in vitro* del NGF (revisado en Apartado 2.2.1). En buena lógica, existe una clara coincidencia en el fenotipo de animales carentes de TrkA y de NGF, sugiriendo que TrkA es el principal mediador de las acciones tróficas del NGF *in vivo*. Asimismo, el fenotipo de estos animales *knockout* es muy similar al observado en aquellos animales expuestos a anticuerpos anti-NGF específicos durante el desarrollo prenatal (Johnson et al., 1980, 1982; Pearson et al., 1983; Carroll et al., 1992; Ruit et al., 1992). Los animales carentes tanto de NGF como de TrkA son viables en el momento del nacimiento, aunque muestran una reducción en la velocidad de ganar peso con la edad. Ambos animales desarrollan úlceras superficiales y presentan evidencias de autoagresión, muriendo la mayoría en el primer mes de vida.

El estudio cuidadoso de los ratones recién nacidos carentes de NGF o TrkA (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994), demuestra la eliminación de neuronas de los ganglios espinales y trigémino, así como una deplección casi total de ganglios simpáticos hacia el día 10 de vida, que quedan reducidos a estructuras rudimentarias. Como ya se pudo comprobar en experimentos basados en el empleo de anticuerpos anti-NGF (Johnson et al., 1980; Carroll et al., 1992; Ruit et al., 1992; Lewin et al., 1994), la pérdida de neuronas de los ganglios espinales se circunscribe principalmente a aquellas neuronas peptidérgicas de pequeño diámetro que inervan las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal, aparentemente implicadas en la nocicepción, la termocepción y la percepción de estímulos olfativos nocivos. Por contra, un número significativo de neuronas de mayor tamaño que expresan receptores TrkB y TrkC siguen presentes en los ganglios espinales de los animales carentes de NGF y/o TrkA (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994). El estudio de animales heterocigotos deficitarios en la expresión de NGF y/o TrkA -cuya supervivencia es mucho más prolongada que la de los animales homocigotos- demuestra que presentan una alteración significativa de la nocicepción (Crowley et al., 1994). En concordancia con estos resultados, ratones transgénicos sobreexpresores de NGF presentan una marcada hiperalgesia a estímulos mecánicos nocivos (Davis et al., 1993c; Albers et al., 1994). Asimismo, el aporte exógeno de NGF puede producir hiperalgesia en animales y humanos (Donnerer et al., 1992; Lewin y Mendell, 1993; Lewin et al., 1992, 1993, 1994; Petty et al., 1994; Lewin, 1995).

En conjunto, el análisis cuidadoso de los animales *knockout* para NGF y TrkA confirma la hipótesis sobre la implicación del NGF en la regulación de la nocicepción durante el desarrollo embrionario, previamente formulada en base a la acumulación de evidencias circunstanciales *in vitro* e *in vivo* (revisado por: Lewin y Mendell, 1993; Woolf et al., 1994).

A nivel del SNC, la situación es menos clara. La supervivencia de las neuronas colinérgicas de los núcleos de la base encefálica -caracterizadas por su capacidad para responder al NGF y expresar TrkA- no se vé afectada de forma notable en relación con la delección génica de NGF y/o TrkA (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994). Únicamente se aprecia una atrofia considerable de estas neuronas, así como una reducción de la síntesis de su principal actividad enzimática neurotransmisora, la colina acetiltransferasa (ChAT), (Crowley et al., 1994) y de la actividad colinesterásica a nivel axonal (Smeyne et al., 1994). Estos resultados podrían ser explicados por la existencia de vías de señalización funcionalmente redundantes que permitirían mantener la supervivencia de dichas neuronas colinérgicas centrales independientemente de la presencia de NGF, aunque esta NT sí participaría en la regulación de su estado funcional y el mantenimiento de su fenotipo colinérgico.

En los animales *knockout* para NGF, tampoco se ven afectadas las proyecciones de estas neuronas colinérgicas al hipocampo y al córtex cerebral (Crowley et al., 1994). En cambio, la delección del receptor TrkA sí conlleva una marcada reducción de las proyecciones de las neuronas colinérgicas de los núcleos de la base al hipocampo y al córtex cerebral (Smeyne et al., 1994). Por este motivo, Smeyne et al. (1994) sugirieron que la disminución de fibras colinérgicas observada probablemente se debe a deficiencias en el crecimiento axonal o en el mantenimiento del fenotipo colinérgico. Interesantemente, se ha sugerido la implicación de las proyecciones colinérgicas de los núcleos de la base hacia el hipocampo y el neocórtex en las funciones de memoria y aprendizaje (Knipper y Yamamura, 1992; Eide et al., 1993). En modelos animales adultos, el NGF ha demostrado ser capaz de regular, al menos parcialmente, dichas funciones superiores del comportamiento (Fischer et al., 1987, 1991; van der Zee et al., 1992, 1995).

4.1.2 *Los knockouts de BDNF, NT-4/5 y TrkB: análisis de la función fisiológica del BDNF y de la NT-4/5*

Los ratones *knockout* para BDNF, NT-4/5 y TrkB también se caracterizan por un fenotipo llamativo. Los animales sin expresión de TrkB, en los que presumiblemente desaparecen las respuestas al BDNF y a la NT-4/5, fallecen en las primeras 24-48 h de vida por su incapacidad total para alimentarse (Klein et al., 1993). Por contra, los *knockout* de BDNF nacen vivos y pueden llegar a sobrevivir unas pocas semanas, aunque con una tasa de crecimiento muy disminuída (Ernfors et al., 1994a; Jones et al., 1994). Los animales más longevos muestran un comportamiento anómalo, que incluye movimientos rotatorios de la cabeza y de extensión de las extremidades durante la locomoción, aparentemente en relación con una inervación sensorial defectuosa de los compartimentos vestibulares del oído interno (Ernfors et al., 1994a). A diferencia de lo que ocurre con los ratones carentes de TrkB o BDNF, los animales *knockout* para la NT-4/5 no tienen una menor expectativa de vida ni muestran alteraciones neurológicas obvias (Conover et al., 1995).

A nivel del SNP, la delección génica del receptor TrkB y de la BDNF se traduce en la desaparición de una proporción importante de determinadas poblaciones neuronales. Por ejemplo, en los ganglios sensoriales espinales el número de neuronas llega a reducirse en un 30-35% (Klein et al., 1993; Ernfors et al., 1994a; Jones et al., 1994). La pérdida de neuronas en los ganglios trigéminos y nodosos de estos animales es de una magnitud similar (Klein et al., 1993; Jones et al., 1994). Otro hallazgo interesante es que, en los animales deficitarios de BDNF, se produce la desaparición casi total de las células neuronales de los ganglios vestibulares así como de los axones vestibulares que inervan el epitelio sensorial de los canales semicirculares, sáculo y utrículo (Ernfors et al., 1994a; Jones et al., 1994). Sin embargo, no parecen existir

alteraciones en las estructuras relacionadas con la audición, como la cóclea y el ganglio espiral. Por tanto, el BDNF es aparentemente necesario para la supervivencia de las células de los ganglios vestibulares implicadas en la detección del movimiento.

A diferencia de lo que ocurre en el SNP, la delección de los genes que codifican BDNF y TrkB tiene una repercusión aparentemente sutil sobre aquellas poblaciones neuronales del SNC capaces de responder al BDNF en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* (revisado en Apartado 2.2.2). En los animales carentes de TrkB y BDNF no se observa una deplección significativa de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, neuronas granulosas del cerebelo o algunas subpoblaciones neuronales del hipocampo y del córtex cerebral (Klein et al., 1993; Jones et al., 1994), aunque sí parece existir un cierto grado de disfunción neuronal de tipo madurativo (Jones et al., 1994; Korte et al., 1995). Este hecho podría reflejar la adquisición, por parte de estas neuronas del SNC, de vías de señalización funcionalmente compensadoras, que las protegerían de la deprivación neurotrófica más eficientemente que a nivel del SNP (Klein, 1994).

Contrastando con la delección de TrkB y BDNF, el fenotipo de los animales deficitarios de NT-4/5 es muy poco llamativo, sin cursar con alteraciones neurológicas obvias (Conover et al., 1995). El estudio comparativo de los fenotipos mutantes de ratones que carecen de BDNF y/o NT-4/5 ha demostrado cómo, a pesar de que estas dos NT's actúan preferentemente a través del mismo receptor Trk, no son requeridas del mismo modo por las diferentes poblaciones neuronales (Jones et al., 1994; Conover et al., 1995; Liu et al., 1995). Por ejemplo, las neuronas sensoriales de los ganglios vestibulares y trigéminos requieren BDNF pero no NT-4/5, de forma que la NT-4/5 no es capaz de compensar la deficiencia de BDNF (Conover et al., 1995; Liu et al., 1995). Por otra parte, las neuronas sensoriales nodoso-petrosas requieren tanto BDNF

como NT-4/5 (Jones et al., 1994; Conover et al., 1995; Liu et al., 1995). El esclarecimiento de este embrollo deberá esperar ineludiblemente a la aparición de animales *knockouts* dobles. En cualquier caso, la levedad del fenotipo de los ratones sin capacidad para sintetizar la NT-4/5 hace suponer la probable implicación de esta NT en el mantenimiento a largo plazo del SN o en las respuestas a la lesión.

4.1.3 *Los knockouts de NT-3 y TrkC: análisis de la función fisiológica de la NT-3*

Los ratones *knockout* para NT-3 (Ernfors et al., 1994b; Fariñas et al., 1994; Tessarollo et al., 1994; Tojo et al., 1995) y TrkC (Klein et al., 1994) presentan un fenotipo espectacular, con posturas anómalas y movimientos pseudoatetósicos de sus extremidades. El estudio morfológico detallado de estos animales ha demostrado cómo estos movimientos distónicos guardan relación con deficiencias importantes a nivel de la propiocepción, es decir, la capacidad del organismo para localizar las extremidades en el espacio.

En los animales neonatales normales, la propiocepción parece depender de la integridad del siguiente circuito: las neuronas de mayor diámetro de los ganglios espinales -que característicamente expresan TrkC (Carroll et al., 1992; Mu et al., 1993)- proyectan las fibras I-a de las raíces dorsales de los nervios espinales hacia el asta anterior de la médula espinal, así como inervan los husos neuromusculares del tejido muscular en la periferia (Hory-Lee et al., 1993; Mu et al., 1993). Interesantemente, los animales sin expresión de TrkC o NT-3 presentan una pérdida significativa de neuronas en los ganglios espinales -fundamentalmente a expensas de las de mayor diámetro- así como una importante reducción de las fibras aferentes I-a y una ausencia casi total de husos neuromusculares y órganos de Golgi en el tejido muscular y los tendones, respectivamente (Ernfors et al., 1994b; Fariñas et al., 1994;

Klein et al., 1994; Tessarollo et al., 1994; Kucera et al., 1995b; Tojo et al., 1995). Sin embargo, no están afectadas otras proyecciones del asta ventral de la médula espinal, como las que inervan los mecanorreceptores y nociceptores de bajo umbral (Klein et al., 1994). Por otra parte, los animales sin expresión de NT-3 presentan una importante deplección (del orden del 50%) de las neuronas propioceptivas del ganglio trigémino (Ernfors et al., 1994b).

Por consiguiente, parece evidente cómo la correcta función propioceptiva *in vivo* depende de la acción de la NT-3 a través de los receptores TrkC. En el caso concreto de las neuronas sensoriales propioceptivas de los ganglios espinales, se ha apuntado la posibilidad de que la fuente de su aporte necesario de NT-3 sean las MTN's espinales (Ernfors y Persson, 1991; Schecterson y Bothwell, 1992; Mudge, 1993; Oakley et al., 1995), así como los husos neuromusculares (Copray y Brouwer, 1994) con los que establecen contactos sinápticos.

A nivel del SNC, la situación es mucho más compleja. A pesar de que la mayoría de las regiones del SNC expresan TrkC, la delección de TrkC o NT-3 no produce alteraciones significativas, al menos a nivel morfológico, en el desarrollo de la mayor parte de las estructuras del encéfalo, el tronco encefálico, la médula espinal y el cerebelo (Ernfors et al., 1994b; Fariñas et al., 1994; Klein et al., 1994; Tessarollo et al., 1994; Tojo et al., 1995). Tampoco se observan en estos animales alteraciones en el número o la función de las MTN's espinales (Ernfors et al., 1994b; Fariñas et al., 1994; Klein et al., 1994; Tessarollo et al., 1994; Tojo et al., 1995), aunque existen datos que sugieren la desaparición de las MTN's γ , quizás como consecuencia de la pérdida de los husos neuromusculares (Klein et al., 1994; Kucera et al., 1995a).

4.1.4 Los ratones deficitarios de p75

El fenotipo de los *knockout* para p75 es mucho menos severo que el de los animales sin expresión de TrkA (revisado en Apartado 4.1.1). Los animales carentes de p75 son viables y fértiles, aunque presentan una sensibilidad al calor marcadamente disminuída, y desarrollan úlceras cutáneas en sus extremidades durante la edad adulta (Lee et al., 1992a). El estudio morfológico del SNP revela que una reducción de la inervación sensorial de la piel así como del tamaño de los ganglios espinales. Por contra, el tamaño de los ganglios simpáticos y la inervación simpática del iris son normales (Lee et al., 1992a). No obstante, dichos animales presentan una eliminación selectiva de las glándulas pineal y sudoríparas (Lee et al., 1994a). A nivel del SNC, hasta el momento no se han documentado alteraciones significativas en los animales sin expresión de p75 (Lee et al., 1992a, 1994a).

El fenotipo de los animales *knockout* para p75, con una repercusión mucho menos severa sobre las poblaciones neuronales sensibles al NGF que la delección génica del receptor TrkA, sugiere que p75 tiene una función accesoria como receptor modulando la actividad de TrkA, que actuaría como receptor principal para el NGF. Por extensión, esta afirmación es probablemente aplicable a la relación existente entre p75 y los otros receptores Trk. Por tanto, no sorprende el hecho de que las neuronas sensoriales y simpáticas craneales de animales deficitarios de p75 respondan normalmente a concentraciones saturantes de NT's (Davies et al., 1993a; Lee et al., 1994b). A diferencia de lo que ha ocurrido con los animales *knockout* para las diferentes NT's y receptores Trk, el estudio de animales portadores de una delección del gen de p75 no ha contribuído, al menos de momento, de forma decisiva al esclarecimiento de las funciones fisiológicas de este receptor (revisado en Apartado 3.3.2).

4.1.5 ¿Una sólo neurotrofina para cada población neuronal?

Los hallazgos a nivel del SNP descritos en los animales *knockout* para las diferentes NT's y receptores Trk han confirmado, para algunas poblaciones neuronales, uno de los axiomas básicos de la Teoría Neurotrófica en su formulación inicial: la dependencia de un determinado agente neurotrófico durante el desarrollo embrionario (revisado en Apartado 2.1). Las neuronas de los ganglios simpáticos, las neuronas sensoriales nociceptivas, las neuronas sensoriales propioceptivas y las neuronas de los ganglios vestibulares requieren una única NT para su supervivencia, al menos durante algún estadio crítico del desarrollo embrionario. Por otra parte, el estudio comparativo de los fenotipos de animales *knockout* homocigotos y heterocigotos ha demostrado que el número final de neuronas de una determinada población guarda relación con la cantidad disponible del correspondiente agente neurotrófico.

Sin embargo, en el SNC la situación es mucho más compleja. A diferencia de las neuronas del SNP, las del SNC proyectan sus axones y dendritas a múltiples dianas así como reciben información de muchas otras aferencias. Por consiguiente, parece lógico pensar que las neuronas del SNC podrían estar reguladas por señales procedentes de cada una de las células con las que interaccionan. Los estudios de localización génica sugieren que los agentes neurotróficos pueden ser obtenidos de una diversidad de fuentes en el entorno de una neurona además de las células diana contactadas por sus prolongaciones axonales y dendríticas. En general, las neuronas del SNC presentan un patrón complejo de requerimientos neurotróficos. Este hecho queda reflejado en el discreto grado de afectación de las poblaciones neuronales del SNC que presentan todos los animales *knockout* estudiados hasta la fecha, a pesar de que la mayoría de las neuronas del SNC expresan receptores para

NT's (revisado en Apartado 3.2). Por otra parte, existen diferencias importantes en el curso temporal de expresión durante el desarrollo embrionario de las diferentes NT's en el SNC (Friedman et al., 1991; Maisonpierre et al., 1990b). El desarrollo en un futuro no demasiado lejano de animales *knockout* para combinaciones de diferentes NT's y/o receptores, constituirá sin duda una importante fuente de información que nos permitirá aprender más sobre los requerimientos neurotróficos de las poblaciones neuronales del SNC.

4.1.6 ¿Existe redundancia funcional entre los diferentes receptores Trk?

La avalancha de estudios de supervivencia *in vitro* e *in vivo* de diferentes poblaciones neuronales en respuesta a los múltiples agentes neurotróficos conocidos, junto con la constatación de la existencia de una cierta promiscuidad en la interacción entre NT's y receptores Trk -especialmente cuando la concentración de las NT's es elevada- (Soppet et al., 1991; Squinto et al., 1991; Lamballe et al., 1991), han propiciado la idea de que las vías de señalización de las NT's pueden ser redundantes desde un punto de vista funcional, de forma que una vía puede substituir parcial o totalmente la función de otra.

El caso de las neuronas de los ganglios espinales es especialmente ilustrativo. Tanto el NGF, el BDNF o la NT-3 parecen capaces de mantener vivas aproximadamente el 30-60% de las neuronas de los ganglios espinales, llegando al 100% de supervivencia cuando actúan conjuntamente (Maisonpierre et al., 1990a; Rosenthal et al., 1990). Sin embargo, en sentido estricto los ensayos de supervivencia *in vitro* e, incluso, *in vivo* únicamente demuestran que la población neuronal estudiada tiene la capacidad de responder al factor, sin que ello signifique automáticamente que dicha vía de señalización está implicada funcionalmente durante el desarrollo embrionario *in vivo*.

Los animales *knockout* constituyen una herramienta muy útil para analizar la cuestión de la redundancia de las vías de señalización, puesto que permiten eliminar de forma selectiva una vía concreta. Si la vía de señalización estudiada es relevante para el desarrollo neuronal, cabe esperar un fenotipo evidente, mientras que en caso de existir una redundancia funcional el resultado lógico sería la ausencia de fenotipo. Así, el estudio de los ratones *knockout* para las diversas NT's y receptores Trk ha demostrado cómo, por lo menos en algunas poblaciones neuronales del SNP, las vías de señalización de las diferentes NT's no son redundantes desde un punto de vista funcional.

Retomando el ejemplo de las neuronas de los ganglios espinales, se ha podido demostrar cómo distintas subpoblaciones de neuronas de los ganglios espinales embrionarios dependen para su supervivencia de NT's específicas y sus correspondientes vías de señalización. Las pequeñas, neuronas nociceptivas peptidérgicas, dependen del NGF para su supervivencia (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994). Las grandes, neuronas propioceptivas, dependen de la NT-3 (Ernfors et al., 1994b; Fariñas et al., 1994; Klein et al., 1994). Por último, una subpoblación de neuronas de los ganglios espinales, probablemente incluyendo los mecanorreceptores, son dependientes del BDNF (Klein et al., 1993; Jones et al., 1994). Por otra parte, estudios recientes sugieren que al menos algunas neuronas sensoriales son sensibles a más de una NT (Gaese et al., 1994), particularmente durante el desarrollo embrionario precoz (Buj-Bello et al., 1994). Asimismo, queda patente cómo la neutralización de la expresión de una NT no se ve compensada por la acción de las restantes NT's, que sí se expresan normalmente a pesar de la promiscuidad demostrada *in vitro* en la interacción entre las NT's y los

receptores Trk (Soppet et al., 1991; Squinto et al., 1991; Lamballe et al., 1991).

4.1.7 Los circuitos neurotróficos autocrinos y paracrinos

La existencia de circuitos neurotróficos autocrinos y paracrinos ha sido apuntada como un mecanismo adicional de regulación del ambiente neurotrófico de las poblaciones neuronales (revisado por: Davies y Wright, 1995). Aunque estos circuitos parecen estar muy extendidos tanto en el SNP como en el SNC, tradicionalmente han recibido poca atención. La existencia de estos circuitos autocrinos y paracrinos se hipotetizó inicialmente en base a la detección en diversas poblaciones neuronales y sus tejidos diana, de la expresión simultánea de NT's y sus correspondientes receptores (Schechter y Bothwell, 1992).

Posteriormente, los experimentos de delección génica han aportado evidencias mucho más sólidas a favor de la existencia y la implicación fisiológica de estos circuitos neurotróficos autocrinos y/o paracrinos durante el desarrollo embrionario. En concreto, los mecanismos autocrinos podrían tener una función esencial en el mantenimiento y/o la diferenciación de las neuronas embrionarias en etapas precoces en las que aún no dependen del aporte neurotrófico proporcionado por las dianas de innervación (Wright et al., 1992). Por otra parte, también se ha sugerido que estos mecanismos podrían participar en la regulación de la supervivencia de algunas poblaciones neuronales en la edad adulta (Acheson et al., 1995; Wetmore y Olson, 1995; Zhou y Rush, 1995), cuando las células neuronales se hacen progresivamente independientes del suministro neurotrófico de los tejidos diana (revisado en Apartado 1.7).

Los ejemplos de mecanismos autocrinos y/o paracrinos durante el desarrollo embrionario son múltiples. En los ganglios espinales, es posible

detectar subpoblaciones de neuronas sensoriales que sintetizan y responden al BDNF (Ernfors et al., 1991a; Schecterson y Bothwell, 1992; Wright et al., 1992; Acheson et al., 1995) y a la NT-3 (Schecterson y Bothwell, 1992; Chen et al., 1996) a través de los correspondientes receptores específicos. Por contra, no parece que en esta población neuronal el NGF esté implicado en dicho tipo de mecanismos (Schecterson y Bothwell, 1992). Por otra parte, aproximadamente un 10-15% de las neuronas simpáticas expresan ARNm para NT-3 (Schecterson y Bothwell, 1992), a la que son sensibles durante el desarrollo embrionario (Maisonpierre et al., 1990a; Rosenthal et al., 1990; Verdi et al., 1996).

En el SNC, los ejemplos son más abundantes. Las MTN's que responden a la NT-3 durante el desarrollo embrionario (Henderson et al., 1993a; Hughes et al., 1993b) también expresan ARNm para NT-3 (Schecterson y Bothwell, 1992; Henderson et al., 1993a; Wong et al., 1993) y para TrkC (Ernfors et al., 1993; Henderson et al., 1993a; Yan et al., 1993). Asimismo, en la *substantia nigra* existen neuronas que responden al BDNF y expresan niveles elevados de ARNm para BDNF (Hyman et al., 1991). Las neuronas del hipocampo sintetizan ARNm para los receptores TrkB y TrkC (Klein et al., 1990b; Lamballe et al., 1991; Kokaia et al., 1995) y sus correspondientes ligandos BDNF, NT-3 y NT-4/5 (Phillips et al., 1990; Kokaia et al., 1993; Wetmore et al., 1994), habiéndose demostrado la intervención de mecanismos autocrinos y/o paracrinos en la regulación de su supervivencia (Lindholm et al., 1996). También se ha sugerido una posible función autocrina y/o paracrina para el BDNF en el desarrollo y mantenimiento del córtex cerebral (Vázquez y Ebendal, 1991).

4.1.8 La Teoría de la Transición de los Requerimientos Neurotróficos

Una de las aportaciones más relevantes a la Teoría Neurotrófica en los últimos años es la *Teoría de la Transición de los Requerimientos Neurotróficos*, formulada inicialmente por Alun M. Davies y su grupo de investigadores. Esta Teoría, que establece que las neuronas experimentan una transición durante el desarrollo embrionario en cuanto a su dependencia neurotrófica, se desarrolló originalmente a partir de observaciones realizadas en neuronas derivadas de la cresta neural (revisado por: Davies, 1994a). Por ejemplo, las neuronas sensoriales del ganglio trigémino -responsables de la inervación facial- son capaces de sobrevivir *in vitro* independientemente del suministro de NT's cuando todavía no han contactado sus dianas periféricas (Lumsden y Davies, 1983; Ernsberger y Rohrer, 1988; Ernsberger et al., 1989b; Wright et al., 1992; Buchman y Davies, 1993).

Durante este período de “independencia neurotrófica”, el mantenimiento de estas neuronas probablemente depende de mecanismos autocrinos y/o paracrinos mediados por NT's (Wright et al., 1992; Davies, 1994b; revisado en Apartado 4.1.7). A medida que sus axones alcanzan sus dianas, las neuronas trigeminales adquieren una dependencia para su supervivencia de la presencia de BDNF, NT-3 o NT-4/5 en el medio de cultivo, que en etapas posteriores pierden de forma progresiva para hacerse dependientes de NGF (Buchman y Davies, 1993; Davies et al., 1993b; Buj-Bello et al., 1994). Coincidiendo con estos cambios en los requerimientos neurotróficos, las neuronas trigeminales modifican de forma paralela el patrón de expresión de ARNm para las diferentes NT's y sus receptores (Davies et al., 1987; Buchman y Davies, 1993; Wyatt y Davies, 1993; Vogel, 1994; Williams et al., 1995; Pinon et al., 1996). De hecho, la NT-3 está implicada en la inducción de la expresión del ARNm para TrkA (Verdi y Anderson, 1994).

Las neuronas ganglionares de la retina también presentan una transición en sus requerimientos neurotróficos durante el desarrollo embrionario. En etapas precoces de la embriogénesis, la NT-3 estimula la diferenciación de las células neuroepiteliales y la maduración de neuronas retinianas recientemente diferenciadas (De la Rosa et al., 1994). Más tardíamente, en el desarrollo embrionario, el BDNF y la NT-3 estimulan la supervivencia de las células ganglionares de la retina y de las células amacrinas (Johnson et al., 1986b; Barde, 1989; Rodríguez-Tébar et al., 1989; Thanos et al., 1989; De la Rosa et al., 1994).

En el SNP también se observa este fenómeno. En etapas precoces de la embriogénesis, la NT-3 estimula la supervivencia de los neuroblastos simpáticos a través de la activación de TrkC, sin afectar su capacidad de proliferación (Coughlin y Collins, 1985; Birren et al., 1993; Dechant et al., 1993a; DiCicco-Bloom et al., 1993; Vogel, 1994; Verdi et al., 1996). A medida que las neuronas simpáticas empiezan a inervar sus dianas durante los estadios embrionarios tardíos y neonatales, la expresión de TrkC es substituída por la del gen TrkA (Rodríguez-Tébar y Rohrer, 1991; Birren et al., 1993; Dechant et al., 1993a; Vogel, 1994; Zhang et al., 1994b; Wyatt y Davies, 1995). De esta forma las neuronas simpáticas se hacen dependientes del NGF producido por sus tejidos diana de inervación y pierden progresivamente su sensibilidad a la NT-3 (Birren et al., 1993; Dechant et al., 1993a; DiCicco-Bloom et al., 1993; Vogel, 1994). Por otra parte, la Teoría de la Transición de los Requerimientos Neurotróficos también ha sido validada para la población de neuronas sensoriales de los ganglios espinales (Carroll et al., 1992; Ernfors et al., 1992; Schecterson y Bothwell, 1992; Wetmore et al., 1992; Wright et al., 1992; Mu et al., 1993; Pinco et al., 1993; Elkabes et al., 1994; Gaese et al., 1994; Zhang et al., 1994b; White et al., 1996).

La NT-3 parece tener una función esencial durante la embriogénesis precoz como responsable de la supervivencia de los precursores de varias poblaciones neuronales, tanto en el SNP como en el SNC. Los experimentos de delección génica han aportado evidencia adicional a favor de este hecho. Los animales deficitarios de NT-3 (Ernfors et al., 1994b; Fariñas et al., 1994; Gaese et al., 1994; Tessarollo et al., 1994; Tojo et al., 1995) presentan una mayor pérdida de neuronas simpáticas y de los ganglios espinales y trigéminos que los animales sin expresión del receptor TrkC (Klein et al., 1994; Davies et al., 1995; El-Shamy y Ernfors, 1996a, 1996b). Este hallazgo es consistente con la idea de que la delección de la NT-3 conlleva la eliminación de neuronas simpáticas y sensoriales que, en circunstancias normales, acabarían dependiendo de NGF y/o BDNF en etapas más tardías del desarrollo embrionario.

Las neuronas también adquieren nuevos requerimientos tróficos en etapas posteriores de su maduración (Davies, 1994a). Por ejemplo, durante el desarrollo postnatal las neuronas simpáticas de rata adquieren *in vivo* e *in vitro* la capacidad de responder al LIF y al CNTF (Kotzbauer et al., 1994). En concreto, se han definido dos subpoblaciones de neuronas simpáticas: una cuya supervivencia es estimulada por el LIF y el CNTF, y otra cuya muerte es inducida por esos dos mismos factores neurotróficos (Kessler et al., 1993; Kotzbauer et al., 1994). La proporción entre esas dos poblaciones varía a lo largo del desarrollo postnatal de las neuronas. En el caso de las neuronas sensoriales de los ganglios espinales, la mayoría adquieren la capacidad de responder al LIF *in vitro* en etapas muy tardías del desarrollo embrionario (Murphy et al., 1993).

4.1.9 *La participación del CNTF y de moléculas CNTF-oides durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso*

En contra de lo que se hipotetizó en un principio, el CNTF y/o moléculas CNTF-oides parecen tener una función relevante durante el desarrollo embrionario del SN (Stöckli et al., 1991; Ip et al., 1993b; Masu et al., 1993; Sendtner et al., 1994). Los receptores del CNTF están presentes desde estadios muy precoces del desarrollo embrionario en diferentes regiones del SN embrionario de la rata (Ip et al., 1993b, 1995), más concretamente en neuronas en proceso de diferenciación y sus procesos (Koshlukova et al., 1996; MacLennan et al., 1996). Su delección produce en los animales neonatales déficits neuronales severos de predominio motor (DeChiara et al., 1995). Un estudio reciente también ha demostrado que el CNTF, junto con otros factores tróficos, puede dirigir la diferenciación terminal de células precursoras hacia neuronas simpáticas postmitóticas (Ip et al., 1994). Asimismo, se ha propuesto que el CNTF podría tener una función crítica en el establecimiento de interacciones entre las MTN's y el músculo esquelético durante la sinaptogénesis (Ip et al., 1995).

Por otra parte, es ya clásico el conocimiento de que el GPA -la molécula homóloga del CNTF en el pollo- se comporta como un verdadero factor neurotrófico para la población de neuronas parasimpáticas del ganglio ciliar. En el embrión de pollo, este factor (Nishi y Berg, 1979, 1981a; Leung et al., 1992), y no el CNTF (Oppenheim et al., 1991), es capaz de rescatar dicha población neuronal del proceso de *muerte neuronal fisiológica*. Durante ese tiempo, es posible detectar la expresión del ARNm para GPA a nivel de la úvea de los ojos, diana de inervación de las neuronas del ganglio ciliar (Leung et al., 1992). Por último, a diferencia del CNTF, el GPA puede ser segregado por las células que lo producen, ya que cuenta con las secuencias consenso

necesarias (Leung et al., 1992). Aunque se desconocen equivalentes del GPA en los mamíferos, se ha sugerido su existencia en base a estudios recientes en los que se ha analizado el fenotipo de ratones portadores de deleciones génicas para CNTF y para CNTFR α (DeChiara et al., 1995).

4.2 Los factores neurotróficos como factores de regeneración nerviosa

Un caso especialmente interesante e intrigante de funcionalidad de una NT en la edad adulta lo constituye la probable implicación del NGF en la regeneración axonal de las neuronas sensibles a esta NT en los nervios periféricos lesionados. Durante el desarrollo embrionario, tanto en roedores como en humanos, las células de Schwann expresan niveles importantes de NGF y p75 (Yan y Johnson, 1987; Scarpini et al., 1988), que en las primeras semanas de vida disminuyen hasta niveles prácticamente indetectables (Raivich et al., 1985; Heumann et al., 1987a; Yan y Johnson, 1987; DiStefano y Johnson, 1988; Scarpini et al., 1988).

En la edad adulta, tras producirse la sección de un nervio periférico comienza en el segmento distal un proceso degenerativo. En ese contexto, pocas horas después de la lesión las células de Schwann reinician la expresión de NGF (Bandtlow et al., 1987; Heumann et al., 1987b) y p75 (Taniuchi et al., 1986b, 1988; Heumann et al., 1987a; Zhou et al., 1996), manteniéndola con gran intensidad hasta que se produce la regeneración axonal (Taniuchi et al., 1986b, 1988; Heumann et al., 1987a, 1987b). Este hecho parece ser la consecuencia de la invasión del segmento distal en proceso de degeneración por macrófagos (Perry et al., 1987; Brown et al., 1991), que a través de la secreción de interleukina 1 (Heumann, 1987; Heumann et al., 1987a) actúan sobre las células de Schwann. A continuación, los axones de las neuronas sensibles al NGF crecen desde el segmento proximal del nervio lesionado hacia el segmento distal, introduciéndose en él gracias al microambiente favorable

que generan las concentraciones elevadas de NGF (Sandrock y Matthew, 1987). Se ha hipotetizado que las células de Schwann, a través de los receptores de NGF de baja afinidad que expresan en su superficie, captan NGF, creando así un “tapiz” de NGF sobre el que los axones pueden crecer (Johnson et al., 1988a; Taniuchi et al., 1988), favoreciendo de esta forma la regeneración nerviosa.

La regeneración de los axones motores sigue un esquema general parecido, aunque con el CNTF y el BDNF como protagonistas. En condiciones normales, tanto el CNTF (Stöckli et al., 1989, 1991; Friedman et al., 1992; Rende et al., 1992a; Sendtner et al., 1992c) como el GPA (Eckenstein et al., 1990), están presentes en las células de Schwann de los nervios periféricos, aumentando progresivamente sus niveles de expresión desde la época postnatal hasta alcanzar niveles máximos en la edad adulta. Al producirse la lesión de un nervio periférico, se destruyen células de Schwann, con la consiguiente liberación del CNTF (Sendtner et al., 1992c). Al ser captado y transportado retrógradamente por las MTN's lesionadas (Curtis et al., 1993), este factor favorece su supervivencia y regeneración (Sendtner et al., 1990; Thoenen, 1991; Clatterbuck et al., 1994; Sahenk et al., 1994). Tras mantenerse elevados los niveles de expresión de una forma mantenida durante aproximadamente una semana (Sendtner et al., 1992c), las células de Schwann disminuyen considerablemente la producción de CNTF (Friedman et al., 1992; Rende et al., 1992a; Sendtner et al., 1992c) al mismo tiempo que inician la síntesis de BDNF y NT-4/5 (Acheson et al., 1991; Meyer et al., 1992; Funakoshi et al., 1993; Kobayashi et al., 1996).

De esta forma, el BDNF y la NT-4/5 -capaces de estimular la supervivencia de MTN's faciales y espinales axotomizadas (Sendtner et al., 1990, 1992a; Yan et al., 1992; Hughes et al., 1993b; Koliatsos et al., 1994; Li et al., 1994; Novikov et al., 1995; Vejsada et al., 1995)- tomarían el relevo de la función de “primeros auxilios” del CNTF. Por otra parte, en

las MTN's lesionadas se puede detectar un incremento de la expresión de p75 (Raivich y Kreutzberg, 1987a; Yan y Johnson, 1988; Ernfors et al., 1989; Armstrong et al., 1991; Koliatsos et al., 1991; Saika et al., 1991; Hayes et al., 1992; Rende et al., 1992b, 1993; Yan et al., 1994; Friedman et al., 1995) y TrkB (Piehl et al., 1994; Kobayashi et al., 1996), por lo que se ha sugerido la posible acción autocrina del BDNF sobre las MTN's lesionadas. También se ha identificado un incremento de la expresión del GDNF en las células de Schwann tras la lesión de un tronco nervioso (Hammarberg et al., 1996), aunque todavía no se ha caracterizado con precisión la posible implicación de esta NT en los procesos de regeneración nerviosa.

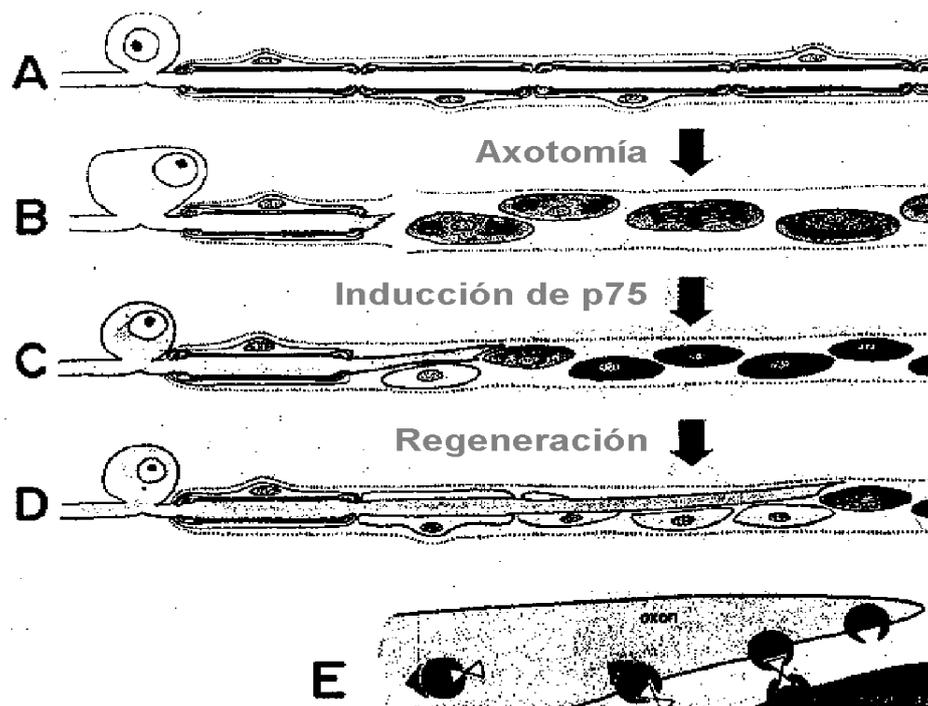


Figura 4.1. Regeneración nerviosa. Tras producirse la axotomía de un nervio normal (B), se origina un incremento de la expresión de NGF y p75 (C), proporcionando un substrato "tapizado" de NGF a los axones en proceso de regeneración (D,E) (adaptado de: Johnson et al., 1988a).

A nivel del SNC adulto, el CNTF también parece actuar como un factor de lesión neuroprotector. Una gran variedad de tipos celulares que

participan en funciones motoras -las MTN's craneales, las neuronas reticulares pontinas y gigantocelulares, las células piramidales del neocórtex, las células de Purkinje cerebelosas y las neuronas del núcleo rojo- expresan receptores para CNTF (MacLennan et al., 1996). Por otra parte, en la edad adulta los astrocitos tipo 1 expresan CNTF (Stöckli et al., 1991; Dobrea et al., 1992), incrementando su nivel de producción en relación con lesiones traumáticas a nivel del SNC (Ip et al., 1993a). De hecho, se ha comprobado cómo el CNTF disminuye la degeneración y muerte inducida por axotomía de las neuronas del tálamo (Clatterbuck et al., 1993), del septo medial (Hagg et al., 1992), de la *substantia nigra* (Hagg y Varon, 1993) y de la retina (Mey y Thanos, 1993).

5. LA HIPÓTESIS DEL CALCIO

Aunque los factores neurotróficos son los principales determinantes de la supervivencia neuronal durante el período de muerte neuronal fisiológica, en los últimos años han aumentado las evidencias que demuestran la implicación en dicho fenómeno biológico de otros factores, como la actividad bioeléctrica (revisado por: Franklin y Johnson, 1992; Franklin et al., 1995). Durante el desarrollo embrionario, es posible inducir la muerte de diversos tipos neuronales mediante la eliminación de sus aferencias neuronales o el bloqueo farmacológico de la actividad eléctrica o neurotransmisión (Lipton, 1986; Maderdrut et al., 1988; Ruitjer et al., 1991; Catsicas et al., 1992; Galli-Resta et al., 1993). Por otra parte, la despolarización crónica de la membrana celular con concentraciones elevadas de K^+ en el medio de cultivo estimula la supervivencia de una larga lista de poblaciones neuronales (Scott y Fisher, 1970; Scott, 1971, 1977; Nishi y Berg, 1981b; Gallo et al., 1987; Koike et al., 1989; Juurlink et al., 1991b; Larmet et al., 1992; Pittman et al., 1993; Nakamura et al., 1994; revisado por: Franklin y Johnson, 1992).

Este efecto neurotrófico de la despolarización de la membrana plasmática está aparentemente mediado por la activación de canales de Ca^{2+} dihidropiridínicos voltaje-dependientes (Collins y Lile, 1989; Collins et al., 1991b; Larmet et al., 1992; Franklin et al., 1995), que al abrirse permitirían un influjo de Ca^{2+} y propiciarían un incremento mantenido de la concentración del Ca^{2+} citoplasmático libre ($[Ca^{2+}]_i$), que en última instancia es el responsable de los efectos de la despolarización sobre la supervivencia neuronal (Collins et al., 1991b; Koike y Tanaka, 1991). E.M. Johnson Jr., basándose en los hallazgos realizados en el modelo de neuronas simpáticas *in vitro*, propuso la Hipótesis del Reostato del Calcio

(*Calcium Set-Point Hypothesis*), que establece que los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ están implicados en la determinación de la dependencia neuronal de los factores neurotróficos, así como de la muerte neuronal cuando la $[Ca^{2+}]_i$ excede un cierto umbral (Koike et al., 1989; Johnson et al., 1992).

5.1 La despolarización crónica bloquea la muerte neuronal *in vitro*

Scott y Fisher, en 1970, fueron los primeros en demostrar que la supervivencia de células neuronales se ve potenciada por la despolarización crónica de su membrana plasmática. En concreto, estos investigadores comprobaron cómo, al mantener neuronas de los ganglios espinales en cultivo en presencia de concentraciones elevadas de K^+ , se lograba un incremento significativo del nivel de supervivencia neuronal. Con el paso de los años, las observaciones de Scott y Fisher (1970) se han ampliado progresivamente a muchos otros tipos neuronales de múltiples especies (Tabla 5.1).

En presencia de concentraciones elevadas de K^+ , el nivel de supervivencia neuronal puede llegar a ser del 100 %, mientras que en su ausencia prácticamente todas las células mueren. Asimismo, durante el período de muerte neuronal fisiológica, la despolarización de las células neuronales puede suplir las acciones de los agentes neurotróficos derivados de los tejidos diana de inervación. Interesantemente, las neuronas mantenidas de esta forma son, desde un punto de vista morfológico, similares a las estimuladas con factores neurotróficos, pudiendo llegar incluso a sobrevivir *in vitro* períodos de tiempo similares. A diferencia de lo que ocurre con la supervivencia neuronal, la despolarización crónica no es capaz de estimular la diferenciación neuronal (Teng y Greene, 1993; Nakamura et al., 1994; Franklin et al., 1995), aunque probablemente sí contribuye a la estabilización de los axones y dendritas de las neuronas (Teng y Greene, 1993).

TIPO NEURONAL	[K ⁺] ÓPTIMA	REFERENCIAS
Neuronas de los ganglios espinales de embrión de pollo	40 mM	Scott y Fisher, 1970 Chalazonitis y Fischbach, 1980
Neuronas de los ganglios espinales de feto humano	20 mM	Scott, 1971, 1977
Neuronas de los ganglios espinales murinos fetales y neonatales	20-40 mM	Scott, 1977
Neuronas de los ganglios espinales de embrión de rata	35 mM	Eichler et al., 1992
Neuronas cerebelosas postnatales de rata	25 mM	Lasher y Zagon, 1972 Gallo et al., 1987
Neuronas simpáticas de embrión de rata	35-50 mM	Koike et al., 1989 Koike y Tanaka, 1991 Lampe et al., 1995
Neuronas simpáticas de embrión de pollo	30-60 mM	Wakade et al., 1988
Neuronas del ganglio ciliar del embrión de pollo	35-40 mM	Nishi y Berg, 1981b Rydel y Greene, 1988 Collins y Lile, 1989 Collins et al., 1991
Neuronas colinérgicas de los ganglios de la base	>30 mM	Nakamura et al., 1994

Tabla 5.1. Reseña de los diferentes tipos neuronales cuya supervivencia en respuesta a la despolarización de su membrana ha sido documentada (adaptado de: Franklin y Johnson, 1992).

5.2 La implicación de canales de Ca²⁺ y la concentración de Ca²⁺ intracelular en la supervivencia neuronal estimulada por la despolarización

En general, la entrada de Ca²⁺ en las neuronas a través de canales voltaje-dependientes, es el principal mecanismo por el que los cambios en los potenciales de membrana influyen sobre el medio intracelular. De forma análoga, Nishi y Berg (1981b) hipotetizaron que la despolarización crónica de la membrana citoplasmática de las neuronas estimula la supervivencia neuronal a través de la activación de canales de Ca²⁺. En concreto, estos investigadores demostraron la capacidad de antagonistas de los canales de Ca²⁺ para bloquear la acción promotora de la despolarización crónica sobre la supervivencia de neuronas del ganglio ciliar del embrión de pollo.

Posteriormente, estos resultados fueron ampliados a otros modelos neuronales, como las neuronas simpáticas, las neuronas de los ganglios espinales y ciliares (Collins y Lile, 1989; Koike et al., 1989; Franklin et al., 1995; Lampe et al., 1995), las neuronas colinérgicas de los ganglios de la base del encéfalo (Nakamura et al., 1994) y las neuronas granulosas del cerebelo (Gallo et al., 1987; Koike, 1991; Pearson et al., 1992).

El estudio farmacológico detallado de este fenómeno ha permitido comprobar cómo los canales de Ca^{2+} activados por la despolarización crónica son del tipo L, al poder ser inhibidos por antagonistas dihidropiridínicos (Gallo et al., 1987; Collins y Lile, 1989; Koike et al., 1989; Galli et al., 1995; Lampe et al., 1995). La activación de estos canales favorece un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que típicamente aumenta desde niveles basales de ~50-100 nM a varios cientos de nM tras la despolarización aguda de la membrana citoplasmática de las células neuronales (Thayer et al., 1988; Tolkovsky et al., 1990). Posteriormente, con la despolarización mantenida, los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ descienden hasta 100-150 nM, aún por encima de los niveles basales (Collins et al., 1991; Koike y Tanaka, 1991; Franklin et al., 1992a).

5.3 La Hipótesis del Reostato del Calcio

Aunque el incremento mantenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es capaz de promover la supervivencia neuronal en el paradigma de la despolarización crónica de la membrana citoplasmática, en otras circunstancias -como la estimulación de las neuronas por aminoácidos excitotóxicos- favorece la muerte neuronal (revisado por: Choi, 1988). La aparente contradicción existente entre estos dos efectos tan distintos del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no es tal, ya que la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ necesaria para estimular la

supervivencia neuronal es muy modesta, claramente menor que la que causa neurotoxicidad. Para explicar el fenómeno de los efectos diferenciales sobre la supervivencia neuronal de distintas $[Ca^{2+}]_i$, E.M. Johnson Jr. y sus colaboradores propusieron la *Teoría del Reostato del Calcio* (*Calcium Set-Point Hypothesis*) (Koike et al., 1989; Franklin y Johnson, 1992; Johnson et al., 1992). Esta Teoría establece la existencia de cuatro niveles de $[Ca^{2+}]_i$ con efectos diferentes sobre la supervivencia neuronal.

Así, existiría un primer nivel de $[Ca^{2+}]_i$ muy reducido, que sería incompatible con la supervivencia neuronal, incluso en presencia de factores neurotróficos. La propuesta de la existencia de este nivel se basa en experimentos que demuestran que niveles de $[Ca^{2+}]_i$ muy bajas son neurotóxicas (Collins y Lile, 1989; Tolkovsky et al., 1990). Por encima de este primer nivel, existiría otro rango de $[Ca^{2+}]_i$ correspondiente a la situación de las neuronas en reposo. Durante el período de muerte neuronal fisiológica, las neuronas dependerían de su exposición a agentes neurotróficos para su supervivencia. A continuación, existiría un tercer nivel de $[Ca^{2+}]_i$ alcanzado cuando los niveles intracelulares de Ca^{2+} aumentan ligeramente, que permitiría la supervivencia de las células neuronales, aún en ausencia de los correspondientes factores neurotróficos. Por último, por encima de un determinado umbral, la $[Ca^{2+}]_i$ resultaría neurotóxica, incluso en presencia de agentes neurotróficos.

De acuerdo con la Teoría del Reostato del Calcio, aparentemente existe una relación inversa en los dos niveles intermedios de $[Ca^{2+}]_i$, dado que la dependencia de las neuronas de sus correspondientes agentes neurotróficos disminuye a medida que aumenta la $[Ca^{2+}]_i$, y *vice versa*. Interesantemente, la interacción entre estas dos variables podría explicar la relación existente entre las influencias de las aferencias y la disponibilidad de tejido diana a la hora de determinar la supervivencia de las células neuronales durante el período de muerte neuronal

programada. Por otra parte, la progresiva reducción de la dependencia que muestran las neuronas hacia sus correspondientes agentes neurotróficos a medida que van madurando (revisado en Apartado 1.7) podría encontrar explicación en un incremento paralelo de la $[Ca^{2+}]_i$ (Koike y Tanaka, 1991; Eichler et al., 1992).

6. EL PROCESO DE MUERTE NEURONAL FISIOLÓGICA ES APOPTÓTICO

Hasta aquí, hemos analizado la problemática de la muerte neuronal fisiológica y del neurotrofismo desde la perspectiva de que los agentes neurotróficos en general “favorecen” la supervivencia y la diferenciación de las neuronas a través de la estimulación de toda una serie de procesos anabólicos. Sin embargo, un enfoque alternativo sería el análisis de la muerte neuronal fisiológica en tanto que se trata de un fenómeno que se produce por privación neurotrófica. Como veremos a continuación, la muerte neuronal fisiológica reúne criterios suficientes para ser considerada apoptótica.

En los últimos años, un gran número de grupos investigadores han realizado un esfuerzo ímprobo para esclarecer los mecanismos desencadenantes de la apoptosis que operan a nivel intracelular. De esta forma, se ha conseguido identificar varias vías de señalización que aparentemente convergen para activar un programa apoptótico común. Sin embargo, una cuestión fundamental, aún no resuelta, es cómo se regula el fenómeno apoptótico para que sólo determinadas células inicien su programa letal en un momento determinado del desarrollo embrionario.

6.1 La muerte neuronal fisiológica es apoptótica

La caracterización de los cambios morfológicos que experimentan las células neuronales durante el proceso de muerte fisiológica (revisado en Apartado 1.5) evidencia su probable naturaleza apoptótica. El término *apoptosis*, de etimología griega, hace referencia a la caída de las hojas o pétalos en otoño. Fue introducido en la literatura científica para diferenciar el proceso de muerte celular fisiológica que se produce durante el

desarrollo embrionario o como parte del recambio celular de órganos y tejidos, de aquél denominado *necrosis* en que hay una destrucción celular como consecuencia de noxas patológicas que desbordan la capacidad homeostática interna de la célula (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Wyllie, 1981; Kerr et al., 1987).

Contrariamente a la necrosis, la apoptosis comporta una progresiva contracción del volumen celular y nuclear, con pérdida de microvellosidades y uniones intercelulares, la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear y la pérdida de la integridad de la envoltura nuclear, siendo la picnosis uno de los fenómenos más característicos (Kerr et al., 1972). Asimismo, Miller et al. (1993) han documentado la aparición de cambios en la matriz nuclear. Por contra, los orgánulos citoplasmáticos son preservados inicialmente (Kerr et al., 1972). Las células afectadas se separan en fragmentos con límites membranosos que son fagocitados rápidamente por macrófagos y por las células vecinas (Kerr et al., 1972; Duvall y Wyllie, 1986; Raff, 1992; Cohen, 1993; Savill et al., 1993).

Una vez en el interior de los fagosomas, los cuerpos apoptóticos experimentan un proceso que ultraestructuralmente es muy similar a la necrosis coagulativa, que es muy rápido y que se puede completar en el plazo de unas pocas horas de forma asincrónica (Kerr et al., 1972). El mecanismo de eliminación celular es tan veloz que, incluso si la tasa de muerte celular es elevada, la fracción de células apoptóticas reconocibles en un momento dado es reducida. A pesar de que las dimensiones del proceso de muerte apoptótica pueden ser masivas, gracias a que los contenidos celulares están "sellados" en el interior de las células moribundas hasta que son fagocitadas, no se produce ni liberación de enzimas proteolíticos ni generación de metabolitos reactivos de oxígeno ni inflamación ni desorganización histológica en los tejidos y órganos.

	NECROSIS	APOPTOSIS
MECANISMO	Pasiva Muerte patológica	Activa Suicidio celular fisiológico Requiere expresión génica y síntesis proteica
INDUCCIÓN	Destrucción celular Lesión celular	Señales de activación Comunicación intracelular
PREVENCIÓN		Modulación de la señalización celular Expresión de genes supresores de la muerte programada celular
CONSECUENCIAS	Muerte de células próximas Inflamación Lesiones tisulares Cicatrización	Ingestión de los cuerpos apoptóticos por las células vecinas
MORFOLOGÍA DEL CITOPLASMA	Edema celular Pérdida de la integridad de membrana Eflujo del contenido intracelular Liberación de proteasas Edema mitocondrial Ruptura celular	Contracción celular Integridad de membranas Blebbing de membranas Fragmentación celular en cuerpos apoptóticos
NÚCLEO	Disolución nuclear tardía	Condensación cromatínica precoz Fragmentación de la cromatina Pérdida de integridad de la membrana nuclear Fragmentación del ADN: en fragmentos grandes en fragmentos internucleosomales
IDENTIFICACIÓN	Pérdida de exclusión con colorantes vitales Microscopía óptica y electrónica	Microscopía óptica y electrónica Microscopía de fluorescencia (colorantes nucleares) Citofluorometría de flujo (colorantes nucleares) Marcaje <i>in situ</i> (fragmentos de ADN) Electroforesis en geles de ADN: fragmentos de 50 y 300 pkb fragmentos de 180 pb

Tabla 6.1. Principales diferencias entre necrosis y apoptosis (adaptado de: Ameisen, 1994).

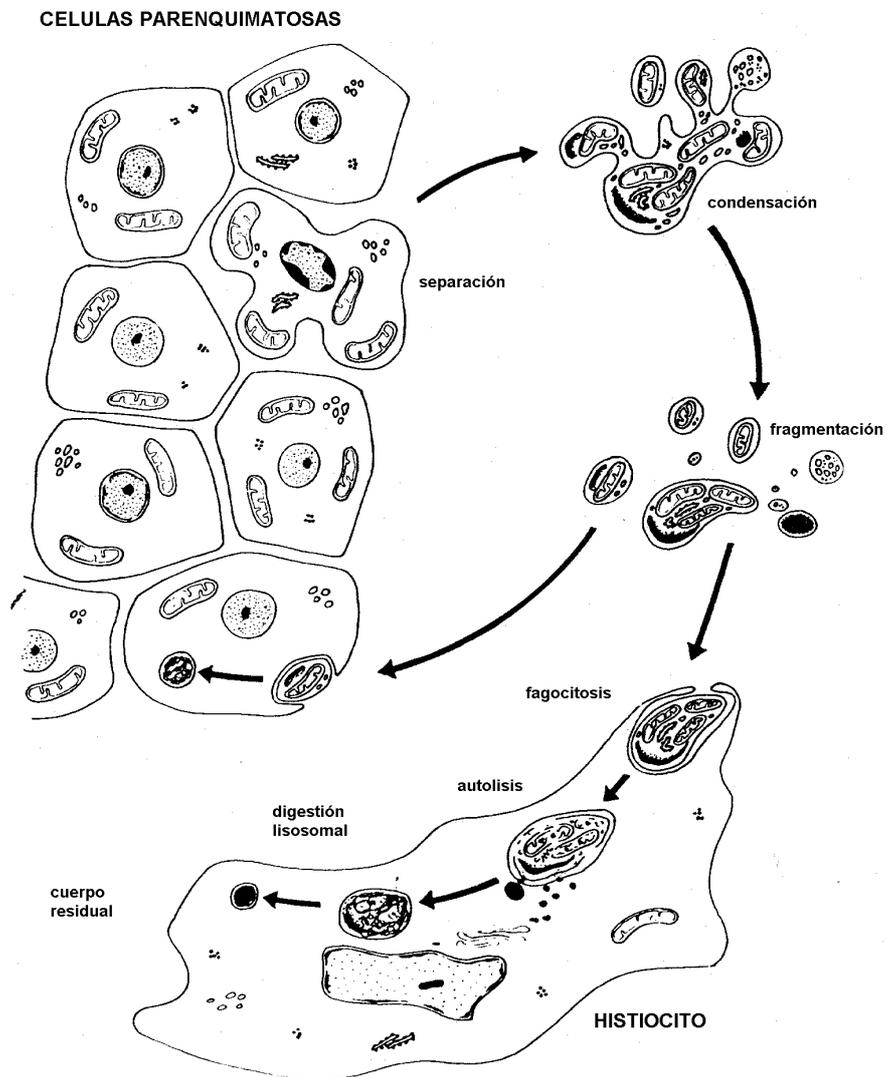


Figura 6.1. Aspectos morfológicos de la muerte apoptótica (adaptado de: Kerr et al., 1972).

6.2 La muerte neuronal fisiológica es un proceso activo

El hecho de que los núcleos y nucleolos tiendan a estar preservados hasta fases tardías de la muerte celular apoptótica, fue inicialmente interpretado como una evidencia a favor de la probable implicación de la síntesis de ARN y proteínas en el proceso apoptótico

(Wyllie et al., 1980). En el caso de la muerte neuronal fisiológica durante el desarrollo embrionario, se ha demostrado el requerimiento de la síntesis activa de proteínas y ARN. Diferentes inhibidores de la síntesis macromolecular impiden la muerte de neuronas simpáticas *in vitro* inducida por privación de su factor neurotrófico por excelencia, el NGF (Martin et al., 1988; Pittman et al., 1993).

Observaciones similares han sido realizadas para otros tipos neuronales dependientes de factores neurotróficos diferentes del NGF (Scott y Davies, 1990; Edwards et al., 1991; Mesner et al., 1992; D'Mello et al., 1993; Fahrbach et al., 1994; Harvey et al., 1994; Svendsen et al., 1994; Kubo et al., 1995). Asimismo, Oppenheim et al. (1990) han demostrado que la inhibición de la síntesis macromolecular evita la muerte fisiológica de neuronas sensoriales de los ganglios espinales y de las MTN's espinales en el embrión de pollo *in vivo*.

Se ha comprobado cómo durante el proceso de apoptosis las neuronas sobreexpresan de forma reproducible diversas proteínas que, dada su aparente localización nuclear, podrían corresponder a reguladores transcripcionales (Villa et al., 1994; Amess y Tolkovsky, 1995). La muerte neuronal fisiológica también requiere la síntesis proteica en los SN's de los insectos *Manduca sexta* (Fahrbach y Truman, 1988) y *Drosophila* (Kimura y Truman, 1990).

En base a todas estas observaciones, la muerte neuronal fisiológica puede ser conceptualizada como un proceso activo, reflejo de la expresión de un programa de autodestrucción de la célula, capaz de ser suprimido por las moléculas neurotróficas. Dicho programa se articularía a través de la regulación de la expresión de unos genes específicos denominados "suicidas" o tanatogenes, y las correspondientes proteínas "asesinas" o tanatinas, que en última

instancia serían las responsables de matar a la célula neuronal de una forma activa (Johnson et al., 1989).

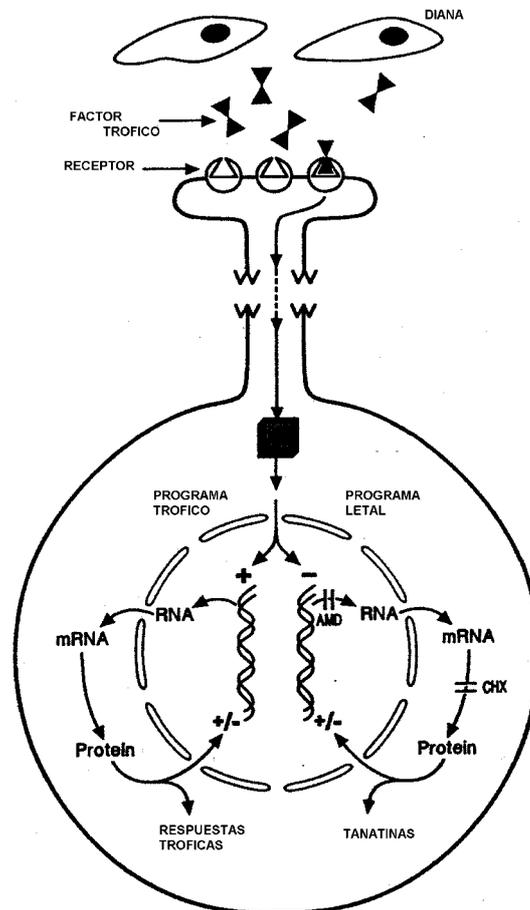


Figura 6.2. Modelo de las acciones de las NT's sobre las neuronas. La presencia de factor neurotrófico estimula un "programa trófico" mientras que la privación neurotrófica desencadena un "programa letal" (adaptado de: Martin et al., 1990).

Por una mera cuestión de inercia histórica, a menudo se utiliza incorrectamente el término *muerte celular programada* como sinónimo de *apoptosis*, ya que en ambos casos están implicados programas genéticos. Ante este confuso panorama, un grupo de científicos internacionales procedentes de diferentes áreas de investigación ha insistido en la necesidad de utilizar correctamente el término *apoptosis* (Alles et al., 1991): *apoptosis* es una definición morfológica de un tipo

concreto de muerte celular, mientras que *muerte celular programada* es una definición funcional que hace referencia a un tipo de muerte celular que acontece durante el desarrollo embrionario con un patrón temporal y de localización altamente reproducible entre diferentes individuos.

También es importante reseñar que, a medida que se ha ido avanzando en el conocimiento del proceso apoptótico, se ha comprobado que engloba una cierta heterogeneidad a nivel morfológico (Pilar y Landmesser, 1976; Chu-Wang y Oppenheim, 1978a; Cunningham, 1982; Clarke, 1990). Por otra parte, se ha de resaltar que no toda muerte celular programada es apoptótica, así como que existen algunos ejemplos de apoptosis que ocurren sin neoexpresión de genes (Schwartz y Osborne, 1993). Esta heterogeneidad presumiblemente refleja la existencia de diferentes mecanismos celulares y moleculares implicados en los fenómenos que desencadenan la muerte apoptótica de las neuronas y de otros tipos celulares.

6.3 Apoptosis y fragmentación del ADN

Si bien inicialmente la definición de apoptosis se estableció a nivel morfológico (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Wyllie, 1981; Kerr et al., 1987), se ha ido avanzando en el conocimiento de otros rasgos diferenciales de este tipo de muerte celular. La fragmentación del ADN es el principal fenómeno molecular que, hasta este momento, ha podido ser correlacionado claramente con el proceso apoptótico (Kerr et al., 1972; Wyllie, 1980; Wyllie et al., 1980). En la apoptosis, el patrón de degradación del ADN es muy ordenado, contrariamente a la degradación aleatoria e irregular del ADN mediada por la liberación de nucleasas y proteasas que se produce en la necrosis (Wyllie, 1980; Wyllie et al., 1981; Duvall y Wyllie, 1986; Kerr y Harmon, 1991). En las neuronas apoptóticas,

se observa una amplia condensación cromatínica que precede a la disrupción de la membrana citoplasmática (Edwards y Tolkovsky, 1994).

Dicho fenómeno es, aparentemente, la traducción de la degradación endonucleásica del ADN genómico en fragmentos oligonucleosomales de forma regular (Kerr y Harmon, 1991). En el caso de las neuronas apoptóticas, es posible demostrar la presencia de fragmentación oligonucleosomal de ADN pocas horas después de iniciarse la deprivación neurotrófica (Edwards et al., 1991; Batistatou y Greene, 1991, 1993; Deckwerth y Johnson, 1993; Pittman et al., 1993; Edwards y Tolkovsky, 1994; Ferrer et al., 1994; Mesner et al., 1995).

La fragmentación internucleosomal del ADN ocurre presumiblemente como consecuencia de la activación de endonucleasas endógenas que atacan al ADN en las regiones internucleosomales, donde las histonas proporcionan poca protección contra el ataque endonucleolítico (Wyllie, 1980; Wyllie et al., 1981; Cohen, 1991). Consiguientemente, se liberan fragmentos de 200 pares de bases (pb) o múltiplos de 200 pb, hecho que es evidenciable en geles de agarosa convencionales por la aparición de un escalonado o *ladder* de bandas discretas que corresponden a ~200 pb (mononucleosomas), 400 pb (dinucleosomas), y así sucesivamente. Una vez que las neuronas han fragmentado su ADN, están "comprometidas" a morir y no pueden ser rescatadas mediante la eliminación de la señal apoptótica.

No obstante, cada vez se cuestiona más la relevancia de la fragmentación del ADN en el proceso apoptótico (Barbieri et al., 1992). No todas las formas de apoptosis cursan con fragmentación oligonucleosomal del ADN (Barres et al., 1992; Mesner et al., 1992; Oberhammer et al., 1992, 1993a, 1993b; Cohen et al., 1992; Tomei et al.,

1993), hecho que refuerza la importancia de los criterios morfológicos en la definición de apoptosis.

Aunque originalmente se describió la correlación de la degradación internucleosomal del ADN con la apoptosis (Wyllie, 1980), con el tiempo se ha comprobado que durante la apoptosis se pueden distinguir otros dos tipos de fragmentación del ADN (revisado por: Bortner et al., 1995). En primer lugar, el ADN se puede degradar generando fragmentos de 50-300 kilopares de bases (kpb) de longitud (Brown et al., 1993; Oberhammer et al., 1993a). Estos fragmentos son degradados a continuación a fragmentos más pequeños (10-40 kpb), a partir de los cuáles se liberarán posteriormente los pequeños fragmentos oligonucleosomales (Brown et al., 1993; Oberhammer et al., 1993a). En segundo lugar, es posible observar en células apoptóticas una fragmentación monocatenaria del ADN que afecta tanto las regiones del ADN internucleosomales como las asociadas a histonas (Gromkowski et al., 1986, 1988).

No obstante, aún no se dispone de datos suficientes que permitan establecer con seguridad el significado de cada uno de estos tipos de degradación del ADN, pudiéndose tratar, por ejemplo, únicamente de fenómenos artefactuales o de variaciones en función del tipo celular o especie estudiados. Por otra parte, hasta la fecha no se ha demostrado la presencia de estos dos tipos de degradación del ADN -además de la degradación internucleosomal- en las células neuronales apoptóticas.

6.3.1 La actividad endonucleásica en la apoptosis

Existen múltiples evidencias indirectas de la implicación de endonucleasas en el proceso de fragmentación del ADN durante la apoptosis neuronal. Diversos investigadores han obtenido evidencia

farmacológica indirecta de que el NGF probablemente regula negativamente una actividad endonucleásica endógena, que en el caso de la privación neurotrófica se activaría tardíamente en el seno del proceso de muerte apoptótica (Edwards et al., 1991; Batistatou y Greene, 1991, 1993; Altman, 1992; Mesner et al., 1992; Pittman et al., 1993). Sin embargo, aún no se ha podido identificar con precisión la(s) actividad(es) endonucleásica(s) responsable(s) de la degradación del ADN durante la apoptosis neuronal. De hecho, cabe suponer la participación de diferentes enzimas endonucleásicos dada la existencia de diversos tipos de fragmentación de ADN en la apoptosis. Además, como muchos otros enzimas implicados en procesos biológicos importantes, la activación de endonucleasas podría requerir la preactivación por otros enzimas. La actividad endonucleásica también podría estar suprimida constantemente por inhibidores, siendo necesaria la eliminación de dichos inhibidores para su activación.

Existen varias nucleasas candidatas a participar en la apoptosis, cada una de ellas con propiedades únicas en cuanto a su distribución tisular, dependencias iónicas y pH óptimo (Compton y Cidlowski, 1987). La ADNasa I es una endonucleasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependiente, cuya actividad está aparentemente implicada en la muerte apoptótica de, al menos, varios tipos celulares no neuronales (Compton y Cidlowski, 1987; Zalewski et al., 1993). De hecho, la degradación monocatenaria del ADN que se ve en algunas células apoptóticas es característica de la acción de la ADNasa I. La ADNasa II es una endonucleasa Ca^{2+} -independiente que también parece participar en la fragmentación internucleosomal del ADN en algunos modelos de apoptosis celular (Barry et al., 1993). No hay que olvidar que el Ca^{2+} extracelular no es preciso para que se produzca la degradación internucleosomal del ADN en algunos modelos de apoptosis, como es el de las células PC12 privadas de suero (Batistatou y Greene, 1993). Otra candidata es la endonucleasa NUC18 (Gaido y Cidlowski, 1991). Este enzima es $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependiente y es capaz de

causar la degradación monocatenaria del ADN, por lo que se ha sugerido su implicación en la apoptosis (Bortner et al., 1995). También se ha hipotetizado la participación de la topoisomerasa II en la condensación cromatínica y la degradación del ADN durante la apoptosis (Earnshaw et al., 1985; Gasser y Laemmli, 1987; Adachi et al., 1989; Kaufmann, 1989; Filipinski et al., 1990; Lazebnik et al., 1993).

6.3.2 *La función de los fenómenos nucleolíticos en la apoptosis*

El papel que la fragmentación del ADN tiene en el proceso apoptótico es objeto de una importante controversia en la actualidad. En un principio, se le atribuyó una gran importancia, llegándose a proponer que la fragmentación del ADN era el mecanismo clave para el desencadenamiento de los cambios morfológicos definitorios de la apoptosis (Arends et al., 1990; Buja et al., 1993). En el caso de las células neuronales deprivadas de factor neurotrófico, se hipotetizó que la fragmentación oligonucleosomal del ADN forma parte del mecanismo que "compromete" a la neurona a morir (Edwards et al., 1991; Deckwerth y Johnson, 1993). La activación de endonucleasas durante el proceso apoptótico, además del mero hecho de la degradación del ADN, podría resultar en la reducción de la transcripción de genes específicos esenciales para mantener la integridad celular (Vanderbilt et al., 1982; Anderson et al., 1983) así como en un incremento de la expresión de los miembros de dos familias génicas, *MyD* y *gadd* (Zhan et al., 1994).

Sin embargo, cada vez se cuestiona más el protagonismo de la "muerte nuclear". Existen múltiples ejemplos de apoptosis de células neuronales (Mesner et al., 1992) y no neuronales (Barres et al., 1992; Oberhammer et al., 1992, 1993a, 1993b; Cohen et al., 1992; Tomei et al., 1993; Enright et al., 1994) en los que no se detecta fragmentación del ADN. Barbieri et al. (1992) han demostrado que la inhibición de la fragmentación del ADN no protege a las células de la muerte apoptótica.

Asimismo, existen varios ejemplos de muerte apoptótica en ausencia del núcleo celular (Schwartz y Osborne, 1993; Jacobson et al., 1994; Schulze-Osthoff et al., 1994a). En base a estas apreciaciones, la muerte celular apoptótica puede ser considerada como la consecuencia de una serie de acontecimientos a nivel citoplasmático que sí deben ser considerados como esenciales. En consistencia con esta hipótesis, se ha demostrado la capacidad de extractos citoplasmáticos para inducir la "muerte" de núcleos celulares aislados (Lazebnik et al., 1993; Newmeyer et al., 1994).

6.4 Los mecanismos moleculares de la muerte neuronal apoptótica

La apoptosis neuronal durante el desarrollo embrionario del SN parece ser una respuesta celular activa de carácter fisiológico frente a la carencia de estímulos neurotróficos específicos, que la neurona detecta a través de receptores específicos situados en la membrana plasmática. Las diferentes señales desencadenantes de la muerte celular apoptótica inician una serie de cambios a nivel intracelular así como la activación de una cascada de transducción de señales, que en última instancia comporta la activación de un programa genético de muerte. Los mecanismos moleculares de transducción de la muerte apoptótica son variados: el *stress* oxidativo, la regulación de los niveles de Ca^{2+} , la PKC, el cAMP, la activación del ciclo de la esfingomielina con la consiguiente producción de ceramida, aspectos del metabolismo de los nucleótidos sensibles a la interferencia del arabinósido de citosina (AraC), la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PADPRP), etc. Paradójicamente, en ocasiones estos mecanismos participan de forma aparentemente contradictoria en distintos tipos celulares, probablemente como reflejo de las diferencias existentes a nivel de la dotación genética de los diversos tipos celulares.

La privación neurotrófica de las neuronas embrionarias comporta una serie de cambios bioquímicos a nivel citoplasmático y nuclear (Deckwerth y Johnson, 1993; Mills et al., 1995; Chang y Wang, 1997). La privación neurotrófica se sigue en un breve plazo de tiempo de una rápida reducción de la captación de glucosa así como de la síntesis de proteínas y ARN. A continuación se produce una disminución moderada de la función mitocondrial. En una etapa posterior, es posible detectar la fragmentación oligonucleosomal del ADN (Deckwerth y Johnson, 1993). Por otra parte, durante la muerte celular apoptótica, se produce una acidificación del medio intracelular, que se ha puesto en relación con el colapso celular característico de la apoptosis (Barry et al., 1993; Li y Eastman, 1995; Reynolds et al., 1996).

6.4.1 El stress oxidativo

En condiciones fisiológicas, en las células existe un equilibrio entre la producción de oxidantes celulares y los procesos antioxidantes. Sin embargo, la producción de cantidades excesivas de radicales de oxígeno reactivos (ROR's) parece ser un mecanismo importante de citotoxicidad implicado en el control de la apoptosis, tanto en las células neuronales (ver más adelante) como en las no neuronales (revisado por: McConkey y Orrenius, 1994). Los ROR's pueden producir reacciones en cadena de peroxidación lipídica, modificaciones de los grupos sulfhidrilos de las proteínas, daño a nivel del ADN y cambios en la permeabilidad de la membrana celular. Secundariamente, aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ al liberarse Ca^{2+} de los depósitos mitocondriales y elevarse los flujos de Ca^{2+} desde el exterior en relación con la lesión de la membrana por peroxidación (Koike et al., 1989). Dicho incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ puede comportar a su vez la activación de proteasas encargadas de la degradación de proteínas y ácidos nucleicos (Davies, 1987; Richter, 1987; Richter y Frei, 1988).

Por otra parte, la oxidación proteica podría ser esencial para modificar la transcripción genética. Los ROR's libres podrían actuar como moléculas de señalización a través de factores celulares sensibles al potencial redox, como *c-fos*, *c-jun* o NFκB (Crawford et al., 1988; Shibamura et al., 1988; Devary et al., 1991; Manome et al., 1993; Adcock et al., 1994; Bredesen, 1995), cuya afinidad por el ADN se modifica drásticamente al producirse la oxidación de sus residuos de cisteína. Asimismo, p21ras parece ser otro importante mediador de los ROR's (Lander et al., 1995). Por último, el *stress* oxidativo probablemente interviene también en estadios más tardíos de la apoptosis, como en el inicio de la condensación celular o en los cambios a nivel de la estructura cromatínica de alto orden (McConkey y Orrenius, 1994). Sin embargo, a pesar de todas estas evidencias, el fenómeno apoptótico no depende exclusivamente de la función mitocondrial, ya que la muerte apoptótica puede suceder en ausencia de una cadena respiratoria funcional (Jacobson et al., 1993).

La formación de ROR's tiene un papel relevante en la apoptosis neuronal. En condiciones normales, los factores neurotróficos contribuyen a la regulación del balance oxidativo-antioxidativo. Por ejemplo, el NGF genera resistencia al peróxido de hidrógeno *in vitro*, promoviendo la degradación de los radicales superóxidos y peróxidos de hidrógeno (Tiffany-Castiglioni y Pérez-Polo, 1981; Tiffany-Castiglioni et al., 1982; Jackson et al., 1990a, 1990b). Una posibilidad es que las NT's, como parte de su programa de supervivencia neuronal, estimulen la expresión de ciertos genes, como el de la catalasa o la glutatión peroxidasa, protegiendo así a la célula contra el *stress* oxidativo. Lógicamente, tras la privación neurotrófica, pueden producirse desequilibrios importantes y lesivos en el balance oxidativo-antioxidativo y el metabolismo energético de las neuronas (Pérez-Polo y Haber, 1984; Pérez-Polo y Werrbach-Pérez, 1987; Jackson et al., 1990a, 1990b).

En los últimos años, han surgido una larga serie de evidencias directas e indirectas que demuestran la implicación de los ROR's en la muerte neuronal apoptótica (Hockenbery et al., 1993; Kane et al., 1993; Ratan et al., 1994a; Whittemore et al., 1994; Ferrari et al., 1995; Greenlund et al., 1995a; Rabizadeh et al., 1995; Schulz et al., 1996). Tras producirse la privación neurotrófica, es posible detectar un incremento en la formación de ROR's (Greenlund et al., 1995a) así como niveles significativos de peroxidación lipídica (Hockenbery et al., 1993; Kane et al., 1993). Por otra parte, la muerte apoptótica de diferentes tipos neuronales puede ser neutralizada mediante la aplicación de antioxidantes (Hockenbery et al., 1993; Kane et al., 1993; Ratan et al., 1994a; Schulze-Osthoff et al., 1994b; Ferrari et al., 1995). Incluso se ha hipotetizado que la inhibición de la síntesis macromolecular neutraliza la muerte neuronal por privación neurotrófica mediante la desviación del aminoácido cisteína de la síntesis proteica global hacia la formación del antioxidante glutatión (Ratan et al., 1994b).

La sobreexpresión de la glutatión peroxidasa (Hockenbery et al., 1993) y de la superóxido dismutasa (SOD) (Rabizadeh et al., 1995; Greenlund et al., 1995a) -enzimas implicados en la detoxificación de ROR's-, inhiben la muerte neuronal apoptótica tanto *in vivo* como *in vitro*. Por contra, la disminución de la actividad SOD comporta una mayor susceptibilidad de las neuronas a la apoptosis (Rothstein et al., 1994; Troy y Shelanski, 1994; Greenlund et al., 1995a). Es interesante destacar que se han identificado mutaciones en el gen de la SOD en relación con la forma familiar de la esclerosis lateral amiotrófica (Deng et al., 1993; Rosen et al., 1993; Robberecht et al., 1994), lo que sugiere la participación de ROR's en la muerte apoptótica de las MTN's.

6.4.2 *La regulación de los niveles de Ca^{2+} , la proteína kinasa C y el cAMP*

Existen datos contradictorios sobre la posible implicación del Ca^{2+} en la regulación del proceso apoptótico. En diversos sistemas celulares no neuronales, se ha detectado una clara relación entre la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ y los cambios propios de la muerte apoptótica (McConkey et al., 1988, 1989b; Kizaki et al., 1989; Martikainen e Isaacs, 1990; Caron-Leslie y Cidlowski, 1991; Dowd et al., 1991; Trump y Berezsky, 1992), por lo que se ha sugerido que este catión tiene una importante función reguladora en la apoptosis. Sin embargo, el Ca^{2+} aparentemente no es necesario para todas las formas de apoptosis, por lo que no puede ser considerado como un mediador intracelular primario universal. Existen ejemplos de muerte apoptótica aparentemente independientes de Ca^{2+} (Alnemri y Litwack, 1990; Lennon et al., 1991). Asimismo, la despolarización, que comporta incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$, puede bloquear la apoptosis neuronal producida por la privación neurotrófica (revisado en Capítulo 5).

En las células no neuronales, la PKC también ha sido implicada como mediador de señales apoptóticas (revisado por: McConkey y Orrenius, 1994), aunque en algunos casos la activación de la PKC se ha correlacionado con la inhibición de la muerte celular apoptótica (McConkey et al., 1989a; Lotem et al., 1991). En el caso específico de las neuronas, la PKC está aparentemente implicada en la mediación de la supervivencia neuronal (revisado en Apartado 3.6.4.4), aunque algunos estudios apuntan lo contrario (Rydel y Greene, 1988; Rukenstein et al., 1991).

Globalmente, las observaciones conflictivas en relación con la aparente participación de la PKC en la regulación de la apoptosis, probablemente reflejan respuestas específicas en función del tipo celular,

la naturaleza del estímulo apoptótico o el protocolo experimental. En los últimos años, han aparecido un gran número de drogas que inhiben más o menos específicamente la actividad de la PKC. No obstante, la falta de especificidad en muchos casos y la existencia de mecanismos desconocidos de acción de muchas de estas drogas, han contribuido a una acumulación de datos difíciles de interpretar. Asimismo, las diferencias observadas podrían depender de la implicación de diversas isoformas de PKC en los distintos modelos de apoptosis, así como a nivel de los mecanismos moleculares intracelulares que median la apoptosis. Un área de intensa investigación es la identificación de las dianas de la PKC relevantes para la regulación del proceso apoptótico. Por último, la PKC probablemente estimula diferentes genes específicos involucrados en la apoptosis en función del tipo celular estudiado.

El cAMP es otro señalizador intracelular aparentemente implicado en el proceso apoptótico (McConkey et al., 1990a). En modelos neuronales la elevación de los niveles de cAMP induce cambios a nivel de fosforilación proteica a través de la activación de la PKA, así como la fragmentación del ADN, desencadenando finalmente la muerte apoptótica (McConkey et al., 1990a). Sin embargo, el cAMP es capaz de bloquear la apoptosis de neuronas primarias deprivadas de factor neurotrófico (Rydel y Greene, 1988; Edwards et al., 1991) así como de células PC12 (Rukenstein et al., 1991) y ND7 (Howard et al., 1993). Por consiguiente, la elevación de los niveles intracelulares de cAMP puede tener efectos opuestos sobre el proceso apoptótico dependiendo del contexto celular.

6.4.3 El ciclo de la esfingomielina y la ceramida

En los últimos años se ha caracterizado una nueva vía de señalización implicada en la mediación de la apoptosis: el ciclo de la esfingomielina (revisado por: Hannun y Obeid, 1995). Este ciclo se inicia con la estimulación de la esfingomielinasa a través de la activación de la

fosfolipasa A₂ y la generación de ácido araquidónico (Jayadev et al., 1994). Este enzima hidroliza la esfingomielina presente en las membranas biológicas de las células, generando ceramida (Dressler et al., 1992; Wiegmann et al., 1992).

La ceramida es una molécula integrante de la estructura y el metabolismo de los esfingolípidos (Hannun, 1994). En el seno del ciclo de la esfingomielina, parece funcionar como un mediador crucial de la apoptosis al actuar como un segundo mensajero capaz de activar una cascada de proteína kinasas (Hannun, 1994; Hannun y Obeid, 1995) y de inducir la fragmentación internucleosomal del ADN de forma específica (Obeid et al., 1993) y, en última instancia, la muerte apoptótica de una diversidad de tipos celulares diferentes (Jarvis et al., 1994). Hasta el momento, el ciclo de la esfingomielina ha sido implicado en la apoptosis inducida por el TNF α y el ligando Fas (revisado por: Hannun y Obeid, 1995; Nagata y Golstein, 1995), desconociéndose la relevancia que pudiera tener en la mediación de la muerte neuronal apoptótica por privación neurotrófica.

El mecanismo preciso de acción de la ceramida para desencadenar la apoptosis es poco conocido. Este mensajero es capaz de activar directamente la PKC ζ (Lozano et al., 1994) así como diversas proteínas con actividad enzimática, entre las que destacan una fosfatasa denominada CAPP (proteína fosfatasa activada por ceramida) (Dobrowsky et al., 1993; Wolff et al., 1994) y una kinasa conocida como CAPK (proteína kinasa activada por ceramida) con capacidad para activar y fosforilar Raf (Hannun, 1994; Heller y Kronke, 1994; Joseph et al., 1994; Kolesnick y Golde, 1994; Yao y Cooper, 1995b), que a su vez desencadena la activación de la cascada de las MAPK's (revisado en Apartado 3.6.3.2.2). Por último, la ceramida también podría estar implicada en la regulación de factores transcripcionales, como NF κ B

(Dbaibo et al., 1993; Yang et al., 1993; Carter et al., 1996) o *c-myc* (Wolff et al., 1994).

6.4.4 *El arabinósido de citosina y el metabolismo de los nucleótidos*

El metabolismo de las purinas y pirimidinas parece estar en íntima relación con los mecanismos bioquímicos para la inducción de la muerte neuronal apoptótica (Wallace y Johnson, 1989; Martin et al., 1990; Tomkins et al., 1994; Dessi et al., 1995; Wakade et al., 1995). El antimitótico arabinósido de citosina (1- β -D-arabinofuranosilcitosina, AraC) es un antimetabolito pirimidínico estructuralmente relacionado con la 2'-deoxicitidina (dC), que se introduce en las células mediante difusión facilitada a través de un transportador transmembranario (Plagemann et al., 1978; Wiley et al., 1982; Young y Jarvis, 1983). Tras experimentar sucesivas fosforilaciones, es incorporado en el ADN, inhibiendo a continuación su síntesis (Kufe y Major, 1982) y produciendo una muerte celular apoptótica (Fram y Kufe, 1982; Masuck et al., 1990; Chen y Goz, 1991; Gunji et al., 1991; Gorczyca et al., 1993a).

Sin embargo, el AraC puede afectar células postmitóticas, como las neuronas. El AraC inhibe *in vitro* la supervivencia de neuronas simpáticas, parasimpáticas y sensoriales estimulada por factores neurotróficos (Wallace y Johnson, 1989; Martin et al., 1990; Tomkins et al., 1994), así como de las neuronas cerebelosas (Dessi et al., 1995). Otros estudios adicionales también han documentado la neurotoxicidad del AraC *in vitro* (Bustos et al., 1980; Oorschot y Jones, 1986; Smith y Orr, 1987). La muerte neuronal inducida por el AraC mimetiza la ocasionada por privación neurotrófica según criterios morfológicos, bioquímicos -como la degradación internucleosomal del ADN- y farmacológicos, reuniendo los criterios necesarios para ser considerada apoptótica (Martin et al., 1990; Tomkins et al., 1994; Dessi et al., 1995).

Por tanto, la muerte neuronal inducida por el AraC parece requerir la activación de un “programa letal” similar al que opera en la muerte neuronal desencadenada por la privación neurotrófica (Martin et al., 1988). De hecho, Dessi et al. (1995) han identificado en neuronas tratadas con AraC diversas proteínas que se sintetizan más activamente, entre las que se incluyen proteínas de *shock* térmico, proteínas asociadas al citoesqueleto y otras de identidad desconocida. Estos mismos autores sugirieron que algunas de estas proteínas podrían ser similares a las descritas por Villa et al. (1994) en neuronas parasimpáticas privadas de factor neurotrófico.

El mecanismo preciso que subyace la neurotoxicidad del AraC no está del todo aclarado. El AraC necesita acceder al interior de las neuronas a través de un transportador específico (Wallace y Johnson, 1989). Una vez interiorizado, el AraC aparentemente actúa mediante su interferencia con un mecanismo dC-dependiente relevante para la supervivencia neuronal estimulada por el correspondiente factor neurotrófico (Wallace y Johnson, 1989; Martin et al., 1990; Tomkins et al., 1994; Dessi et al., 1995), que es independiente de la síntesis o reparación del ADN (Wallace y Johnson, 1989; Martin et al., 1990).

6.4.5 *La poli(ADP-ribosa) polimerasa*

Recientemente se ha sugerido que las células apoptóticas mueren no por la degradación de su ADN, sino por una serie de acontecimientos metabólicos activos desencadenados por los puntos de ruptura del ADN. En concreto, al producirse un alto nivel de lesión del ADN se activa de forma directa la PADPRP, un enzima capaz de modificar covalentemente las proteínas cromosómicas mediante la utilización de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Monti et al., 1992). El consumo de NAD puede llegar a ser tal que se agoten las reservas celulares de dicho

cofactor, interfiriendo secundariamente con la síntesis de ATP. En esta situación, la muerte celular es inevitable ya que todos los procesos dependientes de energía son inhibidos.

Por tanto, la activación directa de la PADPRP por el ADN lesionado podría funcionar como un desencadenante de la activación de otros procesos que ocurren en respuesta a la degradación del ADN. No obstante, hay varios estudios en contra de que la PADPRP tenga una importancia tan crítica en el desencadenamiento de la muerte celular apoptótica (Barbieri et al., 1992; Kaufmann et al., 1993).

6.4.6 *Los motivos octámeros*

Un acontecimiento precoz en la cascada de fenómenos moleculares y celulares conducentes a la muerte neuronal programada por privación neurotrófica, es una disminución muy considerable (del orden del 90%) en la unión de factor(es) transcripcional(es) a las secuencias del motivo octámero (Wang y Pittman, 1993; Tong y Pérez-Polo, 1996). El motivo octámero es un elemento de 8 nucleótidos que se une en posición *cis* a miembros de la familia de factores transcripcionales con dominio POU, como son Oct-1 y Oct-2 (revisado por: Treacy y Rosenfeld, 1992). En las neuronas, Oct-2 es inducido por las NT's (Wood et al., 1992b; Tong y Pérez-Polo, 1996) así como en relación con su diferenciación (Lakin et al., 1995). La privación de NGF altera la fosforilación de una serie de proteínas, entre las que se incluye un factor transcripcional Oct-2-oide, cuya capacidad de unión al ADN disminuye. Supuestamente, uno o más genes activados por la pérdida de actividad represora Oct-2-oide iniciaría(n) y/o participaría(n) en una cascada de acontecimientos moleculares y bioquímicos, que conducirían a la muerte celular. Wang y Pittman (1993) examinaron la posible implicación de otros elementos de unión a factores transcripcionales, no identificando ningún otro aparentemente implicado en la privación neurotrófica.

6.5 El control genético de la apoptosis

La búsqueda de los genes implicados en la regulación de la apoptosis ha acaparado los esfuerzos de muchos investigadores en los últimos años. Sin embargo, aún no se ha conseguido identificar ningún tanatogén en sentido estricto. Por contra, se ha identificado una larga lista de genes -principalmente oncogenes y factores transcripcionales-, previamente conocidos por su participación en la regulación del ciclo celular y la inducción de la diferenciación celular (revisado por: Silos-Santiago et al., 1995), pero que no pueden ser definidos como tanatogenes ya que no son ni suficientes para inducir apoptosis en todas las circunstancias, ni necesarios para el acontecimiento de todos los tipos de apoptosis. Existe un alto grado de conservación en la evolución desde los nemátodos hasta los humanos en los genes implicados en el control de la apoptosis, hecho que confirma que la apoptosis es un fenómeno fundamental de las células animales.

En los últimos años ha aparecido en la literatura científica la noción de que la apoptosis representa una forma de mitosis abortada (Ucker, 1991; Colombel et al., 1992). Las neuronas que inician el proceso de apoptosis mueren al intentar sin éxito reentrar en el ciclo celular. La integración de las señales que conducen a la neurona a la supervivencia o muerte apoptótica ocurre a nivel de los mecanismos de control que regulan el ciclo celular, de forma que las alteraciones en la regulación de los puntos de control de dicho ciclo probablemente representan un punto final común que, en última instancia, desencadena la maquinaria de muerte celular (Batistatou y Greene, 1993; Rubin et al., 1993; Ferrari y Greene, 1994; Freeman et al., 1994; Harrington et al., 1994; Herrup y Busser, 1995).

A continuación, revisaremos los diferentes genes implicados en el control de la apoptosis, tanto en organismos invertebrados como vertebrados, haciendo énfasis en aquéllos cuya relevancia ha sido demostrada en la muerte neuronal apoptótica por privación neurotrófica.

6.5.1 *Los genes de muerte celular y los genes supresores de la muerte celular en *Caenorhabditis elegans**

Los estudios genéticos realizados en invertebrados han resultado ser muy valiosos para la identificación de genes con funciones críticas en el proceso de muerte celular programada. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* se han identificado una serie de genes que afectan, durante el desarrollo embrionario, a la muerte programada de 105 neuronas y de 26 células no neuronales del total de 1.090 células del hermafrodita adulto (Horvitz et al., 1982; Ellis y Horvitz, 1986; Ellis et al., 1991b; Driscoll y Chalfie, 1992). Estas muertes están controladas de forma muy precisa, de modo que en cada animal mueren las mismas células, cada una a su tiempo característico.

Mediante mutagénesis se ha conseguido identificar los genes necesarios para la muerte celular así como para la supresión de ésta. La inactivación de los genes *ced-3* y *ced-4* comporta la supervivencia de la mayoría de aquellas células que normalmente mueren (Horvitz et al., 1982; Hedgecock et al., 1983; Ellis y Horvitz, 1986; Yuan y Horvitz, 1990; Ellis et al., 1991b; Schwartz y Osborne, 1993). Aparentemente, estos genes sólo se expresan en las células moribundas y no en las ótras que presumiblemente podrían actuar indirectamente regulando la muerte celular (Yuan y Horvitz, 1990, 1992). El gen *ced-3* codifica una nueva proteína con varios sitios potenciales de fosforilación (Ellis et al., 1991b), con un alto grado de similitud a nivel funcional y de secuencia con la cisteína proteasa ICE (Miura et al., 1993; Yuan et al., 1993; Xue y Horvitz,

1995). A su vez, *ced-4* codifica una proteína nueva de 63 kDa con dos dominios potenciales de unión a Ca^{2+} (Ellis et al., 1991b) y una región homóloga al “dominio de muerte” (Bauer et al., 1997) presente en la superfamilia del receptor del TNF (revisado por: Chapman, 1995). El gen *ced-4*, mediante *splicing* alternativo, codifica una segunda proteína menos abundante que, a diferencia de su forma principal, antagoniza la muerte celular (Shaham y Horvitz, 1996). Sin embargo, aún se desconoce cuáles son las funciones precisas de todas estas proteínas.

En contrapartida a *ced-3* y *ced-4*, se ha descrito el gen *ced-9*, cuya acción es evitar la muerte celular. Se cree que *ced-9* actúa antagonizando a *ced-3* y *ced-4* (Hengartner et al., 1992; Hengartner y Horvitz, 1994; Shaham y Horvitz, 1996), consiguiendo así impedir que mueran de forma programada aquellas células que en principio deben sobrevivir. En concreto, se ha demostrado recientemente como para ejercer su función Ced-9 debe interactuar de forma directa con Ced-4, que a su vez se une a Ced-3 y otras proteasas tipo ICE (Chinnaiyan et al., 1997; Spector et al., 1997; Wu et al., 1997). Asimismo, se han identificado otros genes moduladores de la función de *ced-3* y *ced-4*, designados como *ces-1* y *ces-2* (*ces*, *cell death specification*), que contribuyen a especificar qué células de la faringe del nemátodo deben morir (Ellis y Horvitz, 1991). Mientras que el gen *ces-1* favorece el proceso de muerte neuronal, el gen *ces-2* lo inhibe a través de la regulación negativa del gen *ces-1*. Por último, se han identificado hasta siete genes diferentes -*ced-1*, *ced-2*, *ced-5*, *ced-6*, *ced-7*, *ced-8* y *ced-10*- implicados en la fagocitosis de los restos celulares (Ellis et al., 1991a; Hedgecock et al., 1993).

También se ha identificado un gen implicado en la degradación de los restos celulares, que se ha denominado *nuc-1*. Este gen controla una endonucleasa Ca^{2+} -independiente (Sulston, 1976; Hevelone y Hartman, 1988), de forma que en nemátodos mutantes que no expresan *nuc-1* se

observa muerte celular y fagocitosis, pero el ADN picnótico de las células muertas no se degrada (Hedgecock et al., 1983). *Deg-1* y *mec-4* son otros dos genes que conducen a la degeneración de neuronas específicas (Chalfie y Wolinsky, 1990; Driscoll y Chalfie, 1991). La estructura de estos genes recuerda a la de una proteína transmembranaria con propiedades de canal iónico, que al abrirse tendría un efecto letal sobre las células. Por tanto, se ha especulado que podría tratarse de una de las tanatinas de los nemátodos (Chalfie y Wolinsky, 1990).

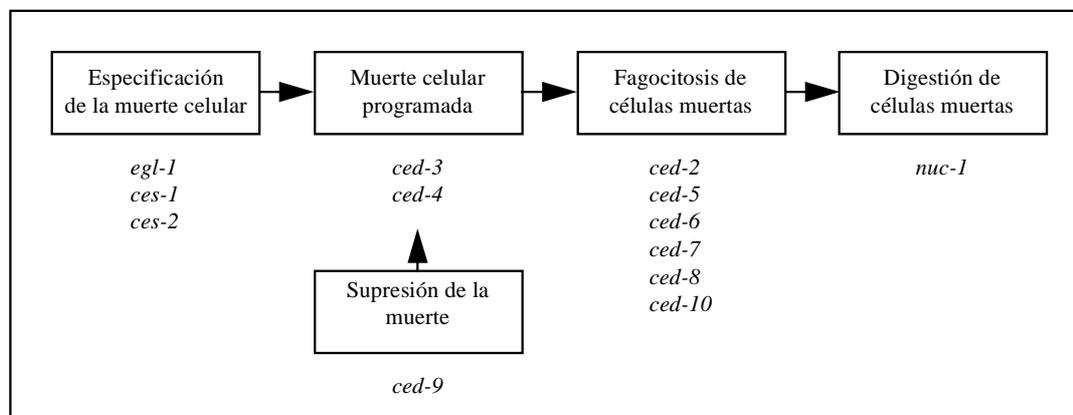


Figura 6.3. Genes implicados en los sucesivos estadios de la muerte celular programada en *C. elegans* (adaptado de: Williams et al., 1992a).

En la actualidad, hay una discusión abierta sobre el grado de similitud entre la muerte neuronal que se observa en los invertebrados y la muerte neuronal fisiológica de los vertebrados. Existen diferencias importantes entre ambas situaciones, como es el hecho de que las interacciones entre las neuronas y sus correspondientes dianas y aferencias parecen tener una relevancia limitada en el desarrollo del SN de los invertebrados. En general, las neuronas de los invertebrados aparentan ser considerablemente más autónomas que las de los vertebrados, siendo capaces de diferenciarse y sobrevivir durante largos períodos de tiempo en ausencia de sus dianas normales (Whittington et al., 1982; Weeks y Truman, 1985).

6.5.2 El protooncogén *bcl-2* y sus homólogos

Diversos estudios en diferentes modelos animales sugieren que proteínas de la familia génica *bcl-2* participan de forma directa en la regulación del inicio de la apoptosis en muchos tipos celulares. El gen *bcl-2* fue descrito como consecuencia de su sobreexpresión debido a una mutación por traslocación t(14,11) que tiene como resultado el desarrollo de neoplasias de tipo linfoma linfoblástico centrofolicular (Cleary et al., 1986; Chen-Levy et al., 1989). La relevancia de la proteína Bcl-2 en la regulación de la apoptosis de células de estirpe hemopoyética ha sido ampliamente estudiada (revisado por: Korsmeyer, 1992), hallando una sólida confirmación en los experimentos de delección génica que muestran una deplección de linfocitos en los compartimentos linfocitarios (Veis et al., 1993) así como una sensibilidad aumentada a los estímulos desencadenantes de la muerte apoptótica (Miyashita y Reed, 1992; Nakayama et al., 1993, 1994).

El protooncogén *bcl-2*, que codifica una proteína integral de membrana de 26 kDa de naturaleza desconocida (Nguyen et al., 1993a), presenta un importante grado de homología a nivel de secuencia con el gen *ced-9* del nemátodo *C. elegans* (Hengartner y Horvitz, 1994). De hecho, *bcl-2* puede substituir a *ced-9* en la inhibición de la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans* (Vaux et al., 1992), lo que también sugiere un elevado grado de homología funcional. *Bcl-2* pertenece a una familia creciente de genes relacionados que comparten homología a nivel de sus secuencias y que tienen efectos funcionales opuestos sobre la regulación del proceso apoptótico. Todas estas proteínas presentan un extremo carboxi-terminal hidrofóbico, que es el responsable de dirigirlas hacia las membranas mitocondriales, el retículo endoplasmático rugoso y las membranas nucleares (Chen-Levy et al., 1989; Hockenbery et al., 1990; Alnemri et al., 1992; Jacobson et al., 1993;

Nguyen et al., 1993a; Krajewski et al., 1993, 1994a; Akao et al., 1994; Givol et al., 1994; González-García et al., 1994; Janiak et al., 1994; de Jong et al., 1994; Lithgow et al., 1994; Riparbelli et al., 1995) y que aparentemente no influye sobre su funcionalidad (Hockenbery et al., 1993; Borner et al., 1994; Hunter et al., 1996). Entre los miembros de la familia Bcl-2 de proteínas intracelulares asociadas a membrana, se incluyen Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bad y Bak, la proteína adenovírica E1B 19K y MCL-1, teniendo todos ellos una importante función en la regulación de la supervivencia y muerte de diferentes tipos celulares. Curiosamente, Bcl-2 puede interactuar físicamente con diversos miembros de la familia *bcl-2*, incluyendo Bax, Bcl-X_L, Bcl-X_S y MCL-1 (Oltvai et al., 1993; Sato et al., 1994).

La proteína Bax (*bcl-2-associated X-protein*), con un elevado grado de homología con Bcl-2, fue identificada por su capacidad de dimerizar con Bcl-2 (Oltvai et al., 1993; Thomas et al., 1995). La sobreexpresión de Bax acelera la muerte celular apoptótica (Oltvai et al., 1993; Yin et al., 1997) y contrarresta la acción supresora de la apoptosis de *bcl-2* (Oltvai et al., 1993), aunque paradójicamente se ha comprobado su capacidad para promover, de forma transitoria, la supervivencia de neuronas privadas de factor neurotrófico así como de antagonizar el efecto estimulador de la supervivencia neuronal de los factores neurotróficos (Middleton et al., 1996). El estudio de animales portadores de una delección del gen *bax* ha demostrado cómo globalmente la proteína Bax, además de promover la muerte celular, también puede potenciar la supervivencia de ciertos tipos celulares (Knudson et al., 1995). En general, se piensa que la proporción entre *bcl-2* y *bax*, como si se tratara de un reostato, determina la supervivencia o muerte en respuesta a un estímulo apoptótico: el exceso de Bcl-2 condicionaría la supervivencia celular mientras que el exceso de Bax produciría la muerte (Oltvai et al., 1993; Oltvai y Korsmeyer, 1994; Korsmeyer, 1995). Algunos autores han

llegado a sugerir que Bax mediaría la muerte celular, siendo inhibido por Bcl-2 a través de la formación de heterodímeros (Yin et al., 1994a).

Mediante el escrutinio de genotecas de ADNc, se descubrió otro gen de la familia *bcl-2*, bautizado como *bcl-X* (Boise et al., 1993; González-García et al., 1994). Este gen, con un alto grado de homología con *bcl-2*, codifica mediante *splicing* diferencial dos proteínas de distintas longitudes, Bcl-X_L y Bcl-X_S. A diferencia de la forma larga, Bcl-X_S tiene una delección de 63 aminoácidos en una región que está altamente conservada en otros miembros de la familia génica de *bcl-2* y que, por consiguiente, se cree que es muy importante a nivel funcional (Boise et al., 1993). Se ha comprobado cómo Bcl-X_L forma un canal iónico pH-sensible selectivo para cationes a pH fisiológico (Minn et al., 1997), con un efecto similar al de *bcl-2*, haciendo las células resistentes a la apoptosis (Boise et al., 1993; Lotem y Sachs, 1993; Miyashita y Reed, 1993; Ohmori et al., 1993; González-García et al., 1994, 1995). La forma corta o Bcl-X_S favorece la inducción de la apoptosis de forma similar a Bax (Boise et al., 1993). No obstante, a diferencia de Bax, Bcl-X_S no dimeriza con Bcl-2 sino que actúa como una forma mutante dominante negativa mediante la competición con sus substratos o reguladores para bloquear la acción inhibidora de la apoptosis de Bcl-2 (Boise et al., 1993).

Bad es otro miembro recientemente identificado de la familia Bcl-2 con capacidad para dimerizar de forma selectiva con Bcl-2 y Bcl-X_L, aunque no con Bax, Bcl-X_S, MCL-1 o consigo mismo (Yang et al., 1995). Aparentemente, Bad promueve la muerte celular apoptótica al dimerizar con Bcl-2 y Bcl-X_L. De esa forma, Bad favorece un exceso de Bax, que a su vez condiciona la muerte celular apoptótica (Yang et al., 1995).

El oncogén adenovirico E1B codifica dos productos capaces de suprimir la apoptosis, uno de 19 kDa con un grado modesto de homología a nivel de secuencia con Bcl-2 (Debbas y White, 1993; Chiou et al., 1994) y otro de 55 kDa que inhibe directamente la acción de *p53* (Yew y Berk, 1992). La proteína E1B 19K puede inhibir la muerte celular apoptótica desencadenada por múltiples estímulos (Gooding et al., 1991; Hashimoto et al., 1991; Rao et al., 1992a; Martinou et al., 1995), presumiblemente a través de la inhibición de Bak, otro nuevo miembro de la familia *bcl-2* recientemente identificado. *Bak* (*bcl-2-homologous antagonist/killer*) es capaz de estimular la muerte celular apoptótica (Chittenden et al., 1995a, 1995b; Farrow et al., 1995; Kiefer et al., 1995) probablemente de forma análoga a Bax a través de la antagonización de Bcl-2 (Farrow et al., 1995). Además de con Bcl-2, la proteína Bak es capaz de interactuar con Bcl-X_L y la proteína E1B 19K del adenovirus (Chittenden et al., 1995; Farrow et al., 1995).

Por último, se han identificado varios genes adicionales, miembros de la familia *bcl-2*, en genomas virales (*BHRF1*, del virus Epstein-Barr, y *LMW5-HL*, del virus de la peste porcina africana) (Henderson et al., 1993b; Neilan et al., 1993), así como en células de mamíferos (*A1* y *mcl-1*) (Kozopas et al., 1993; Reynolds et al., 1994). Aunque se ha sugerido que el gen *BHRF1* es capaz de suprimir el proceso apoptótico (Henderson et al., 1993b), se desconoce aún si estos genes pueden modular la apoptosis.

6.5.2.1 La familia *bcl-2* y el control de la supervivencia neuronal

Como ocurre con otros tipos celulares no linfoides, la familia génica del *bcl-2* también parece intervenir en el control de la supervivencia neuronal (revisado por: Merry y Korsmeyer, 1997). Llama la atención la amplia distribución de la expresión de estos genes en el SNC y el SNP,

tanto en el desarrollo embrionario como en la edad adulta (Hockenbery et al., 1991; Merry et al., 1994; Krajewski et al., 1994a, 1994b; González-García et al., 1994, 1995; Frankowski et al., 1995; Kiefer et al., 1995; Mizuguchi et al., 1994, 1996; Sugimoto et al., 1996; Alonso et al., 1997). En concreto, durante el desarrollo embrionario la expresión de Bcl-2 se mantiene a muy altos niveles a lo largo del período de muerte neuronal programada de múltiples poblaciones neuronales -incluyendo las MTN's-, disminuyendo posteriormente de forma gradual (Abe-Dohmae et al., 1993; Castrén et al., 1994; Merry et al., 1994; Michaelidis et al., 1996).

Análogamente a lo que ocurre en otros tipos celulares, mientras que Bak (Chittenden et al., 1995a; Farrow et al., 1995; Kiefer et al., 1995) y Bax (Gillardon et al., 1996; Vekrelis et al., 1997) son capaces de estimular la muerte apoptótica de las neuronas, las proteínas Bcl-2 (García et al., 1992; Batistatou et al., 1993; Mah et al., 1993; Zhong et al., 1993; Allsopp et al., 1993b, 1995; Martinou et al., 1994; Farlie et al., 1995), Bcl-X_L (González-García et al., 1995) y E1B 19K (Martinou et al., 1995), promueven la supervivencia de diferentes poblaciones neuronales privadas de sus correspondientes NT's.

Por contra, la inactivación *in vivo* de *bcl-2* o *bcl-X* induce la muerte apoptótica de un gran número de neuronas del SNC y SNP (Motoyama et al., 1995; Michaelidis et al., 1996). En concreto, la delección de *bcl-2* induce la degeneración progresiva de neuronas motoras, sensoriales y simpáticas durante el desarrollo postnatal precoz (Michaelidis et al., 1996). Asimismo, Bcl-2 se comporta como un importante regulador de la supervivencia de las neuronas simpáticas (Greenlund et al., 1995b) y, probablemente también, las MTN's espinales (Martinou et al., 1994) en el período de muerte fisiológica durante el desarrollo embrionario. En la edad postnatal, la sobreexpresión de *bcl-2* protege a las MTN's (Dubois-Dauphin et al., 1994; Farlie et al., 1995; Sagot et al., 1995; de Bilbao y Dubois-Dauphin, 1996) y las células ganglionares de la retina (Bonfanti et

al., 1996; Cenni et al., 1996) de la muerte inducida por axotomía. Por último, se ha implicado a Bcl-2 en la mediación de la respuesta de supervivencia de las NT's (Allsopp et al., 1995).

No obstante, se desconoce si estas observaciones pueden ser generalizables a todas las poblaciones neuronales y, más importante aún, cómo se regula la expresión de los diferentes integrantes de la familia génica *bcl-2* durante el proceso de muerte neuronal fisiológica en el desarrollo embrionario del SN. Algunas poblaciones neuronales, como las neuronas parasimpáticas y propioceptivas sensibles al CNTF, no son rescatadas por la sobreexpresión de Bcl-2 (Allsopp et al., 1993, 1995). Estos resultados sugieren la existencia, al menos en varias poblaciones neuronales, de mecanismos intracelulares de apoptosis independientes de *bcl-2*. Por otra parte, recientemente se ha documentado cómo las diferentes NT's no son capaces de influir sobre la expresión de ARNm para *bcl-2* y otros miembros de la familia en células neuronales (Ohga et al., 1996).

6.5.2.2 Mecanismos de acción de las proteínas de la familia *bcl-2*

La supervivencia o muerte de una determinada célula depende de las interacciones entre los diferentes miembros de la familia génica *bcl-2*. Sin embargo, como resulta lógico por circunstancias cronológicas, nuestro conocimiento actual sobre los mecanismos de acción de estas proteínas es muy limitado y está fundamentalmente circunscrito a Bcl-2. Además, surge una complicación adicional al existir un cierto grado de redundancia funcional entre los diversos integrantes de esta familia, como demuestra el hecho de que animales que no expresan Bcl-2 no presentan alteraciones muy importantes en tejidos, como el SN, que en condiciones normales expresan niveles considerables de Bcl-2 (Veis et al., 1993; Nakayama et al., 1994). Indudablemente, el diseño de animales

transgénicos portadores de combinaciones de mutaciones de los diferentes miembros de la familia *bcl-2* aclarará la situación.

En base a su localización a nivel de la membrana mitocondrial interna, diversos autores apuntaron que Bcl-2 podría actuar a modo de un antioxidante a través de la interferencia con la función mitocondrial. La sobreexpresión de *bcl-2* suprime la peroxidación lipídica y evita el daño celular al actuar como una "trampa" para radicales libres reactivos (Hockenbery et al., 1993; Kane et al., 1993; Korsmeyer et al., 1995). Sin embargo, esta hipótesis ha sido rebatida al demostrarse que Bcl-2 sigue siendo capaz de bloquear la apoptosis en ausencia de una cadena respiratoria funcional (Jacobson et al., 1993; Jacobson y Raff, 1995), lo que puede ser interpretado como que ni la apoptosis ni la acción protectora de Bcl-2 son exclusivamente dependientes de la función mitocondrial (Hennet et al., 1993; Jacobson et al., 1993; Mah et al., 1993; Zhong et al., 1993). Incluso se han obtenido evidencias de que Bcl-2 podría funcionar como un agente prooxidante en lugar de antioxidante (Steinman, 1995).

A pesar de que una proporción substancial del Bcl-2 celular se localiza en la membrana nuclear, la presencia del núcleo no parece necesaria, al menos en algunos modelos de apoptosis, para la acción protectora contra la muerte apoptótica de Bcl-2 (Schwartz y Osborne, 1993; Jacobson et al., 1994; Newmeyer et al., 1994). Este hecho sugiere la existencia de, al menos, un regulador citoplasmático importante sobre el que actúan las proteínas de la familia génica *bcl-2*. Las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L pueden bloquear la vía de muerte celular mediada por ceramida (Smyth et al., 1996; Zhang et al., 1996), aunque no la capacidad de este mediador para inducir la parada celular (Zhang et al., 1996). Bcl-2 también es capaz de inhibir la activación de la PADPRP durante la apoptosis (Smyth et al., 1996). Por último, participa en la regulación de la compartimentalización del Ca²⁺ (Baffy et al., 1993; Lam et al., 1994b;

Distelhorst et al., 1996) así como de la homeostasis del pH intracelular durante el proceso de muerte celular apoptótica (Reynolds et al., 1996).

La identificación de proteínas capaces de interactuar con proteínas de la familia Bcl-2 podría ayudar a explicar cómo regulan el proceso apoptótico. Bcl-2 es capaz de interactuar físicamente con R-ras (Fernández-Sarabia y Bischoff, 1993), una proteína relacionada con el oncogén *ras* (Lowe y Goeddel, 1987; Lowe et al., 1987, 1988). R-ras, a pesar de estar emparentada estructuralmente con otras proteínas de la familia p21ras, difiere significativamente en sus funciones biológicas (Lowe y Goeddel, 1987; Lowe et al., 1988). R-ras es capaz de favorecer la muerte celular apoptótica a través de su interacción con Bcl-2 (Wang et al., 1995b). También se ha demostrado la asociación de Bcl-2 con una nueva proteína, BAG-1 (*bcl-2-associated athanogene 1*), que potencia el efecto promotor de la supervivencia celular de Bcl-2 (Takayama et al., 1995; Wang et al., 1996a). En algunas células *bcl-2* y *mcl-1* son capaces de suprimir la inducción de apoptosis mediada por *c-myc* (Bissonnette et al., 1992; Fanidi et al., 1992; Vaux y Weissman, 1993; Wagner et al., 1993; Reynolds et al., 1994; revisado en Apartado 6.5.6).

Por último, recientemente se ha propuesto para Bcl-2 y Bcl-X_L un nuevo mecanismo de acción basado en la interacción de su homólogo Ced-9 con las proteínas Ced-3 y Ced-4 (revisado por: Reed, 1997). Según este modelo, existirían un(os) homólogo(s) mamífero(s) de Ced-4 que, al interactuar con proteasas homólogas a Ced-3, favorecerían la muerte celular apoptótica. Bcl-2 y Bcl-X_L ejercerían su acción anti-apoptótica mediante el secuestro de las proteínas Ced-4-oides, "fijándolas" sobre las membranas intracelulares y evitando así la acción degradativa de las proteasas Ced-3-oides. Por contra, los miembros de la familia Bcl-2 con propiedades pro-apoptóticas (como Bax o Bak), al

dimerizar con Bcl-2 y Bcl-X_L e interferir con su interacción con las proteínas Ced-4-oides, favorecerían indirectamente la acción letal de las proteasas Ced-3-oides.

6.5.3 *Las cisteína proteasas: homólogos de ced-3*

La secuenciación del gen *ced-3* de *C. elegans* permitió comprobar el alto grado de homología que presentaba éste con otro gen mamífero que codifica el enzima conversor de la interleukina 1 β (ICE) (Miura et al., 1993; Yuan et al., 1993; Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994). ICE es una cisteína proteasa no relacionada a nivel de secuencia con ninguna otra proteasa previamente conocida, cuya forma activa consiste de un heterodímero integrado por la asociación de las subunidades p10 y p20 originadas por la proteólisis de un precursor (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992). ICE ha resultado ser el prototipo de una nueva clase de cisteína proteasas que, además de Ced-3, incluye las proteasas Nedd-2/Ich-1 (Yuan et al., 1993; Kumar et al., 1994; Wang et al., 1994; Kumar, 1995), Ich-3 (Wang et al., 1996b), CPP32/Yama/prICE (Fernandes-Alnemri et al., 1994; Lazebnik et al., 1994; Wang et al., 1994; Nicholson et al., 1995; Tewari et al., 1995), Mch2 (Fernandes-Alnemri et al., 1995) e ICE_{rel} (Abbadie et al., 1993). Al menos algunas de estas proteasas se expresan en el SN durante el desarrollo embrionario, disminuyendo sus niveles en la edad adulta (Kumar et al., 1992; Yuan et al., 1993).

La sobreexpresión de Ced-3, ICE, Nedd-2/Ich-1, Ich-3 o ICE_{rel} en células mamíferas produce la apoptosis (Abbadie et al., 1993; Miura et al., 1993; Wang et al. 1994; Kumar et al., 1994; Enari et al., 1995, 1996; Wang et al., 1996b). Dicha acción puede ser contrarrestada específicamente por inhibidores peptídicos de las cisteína proteasas (Slee et al., 1996) así como por la expresión del gen *crmA* del virus de la viruela

(Ray et al., 1992; Gagliardini et al., 1994; Wang et al., 1994), que codifica un inhibidor de las cisteína proteasas tipo ICE (Ray et al., 1992; Tewari et al., 1995), las cuales parecen participar en la mediación de la muerte apoptótica de las neuronas (incluidas las MTN's espinales), desencadenada por la deprivación neurotrófica durante el desarrollo embrionario (Gagliardini et al., 1994; Milligan et al., 1995; Deshmukh et al., 1996; Martinou y Sadoul, 1996; Schulz et al., 1996; Stefanis et al., 1996; Friedlander et al., 1997; Mukasa et al., 1997; Ni et al., 1997; Taylor et al., 1997; Troy et al., 1997).

No obstante, aún se desconocen los mecanismos por los que las proteasas tipo ICE ejercen su acción proapoptótica. La ceramida podría ser importante en la activación de las cisteína proteasas (Smyth et al., 1996). Una vez activados, estas enzimas actúan sobre una variada serie de sustratos, entre los que se incluye la PADPRP (Kaufmann et al., 1993; Lazebnik et al., 1994; Fernandes-Alnemri et al., 1995; Nicholson et al., 1995; Tewari et al., 1995). Asimismo, las proteasas parecen ser responsables de la activación de quinasas ciclina-dependientes necesarias en determinados modelos de apoptosis (Shi et al., 1994; Fotodar et al., 1995). Por último, recientemente se ha sugerido que todas aquellas vías que causan la muerte celular por mecanismos que pueden ser bloqueados por *bcl-2*, culminan con la activación de proteasas tipo ICE (Haecker y Vaux, 1994).

6.5.4 *reaper*

reaper es un gen de *Drosophila* capaz de integrar la información de diferentes vías de señalización para activar el programa apoptótico (revisado por: Steller y Grether, 1994; White et al., 1994). El gen *reaper* codifica un pequeño polipéptido de 65 aminoácidos, que presenta homología con el dominio de muerte del receptor del TNF α (Golstein et

al., 1995). La inactivación de *reaper* se traduce en una supresión de la apoptosis en respuesta a todos los estímulos apoptóticos conocidos hasta la fecha. El inicio de la expresión de *reaper* precede en 1-2 horas a los primeros signos morfológicos de la apoptosis. Asimismo, la expresión de *reaper* es suficiente para inducir la apoptosis en células que, de otra forma, sobrevivirían normalmente (White et al., 1994; Steller, 1995).

Aunque el mecanismo por el que *reaper* induce la muerte apoptótica todavía no está claro, probablemente se sitúa en el punto de convergencia de múltiples vías de señalización de la muerte celular (White et al., 1994). Se ha sugerido que *reaper* codifica una molécula reguladora, que activaría estimuladores de la muerte celular presentes en la mayoría de las células o inhibir otros reguladores negativos de la muerte celular, como Bcl-2 (Raff, 1992).

6.5.5 Factores transcripcionales: las familias fos y jun

Datos recientes sugieren la participación en la muerte neuronal apoptótica por privación neurotrófica de la actividad reguladora transcripcional AP-1, integrada por los diferentes miembros de las familias Fos y Jun (revisado por: Schlingensiepen et al., 1993; Pfarr et al., 1994). Durante dicho proceso es posible detectar un incremento transitorio de la expresión de *c-jun*, primero, y de *c-fos* y *fosB*, a continuación, en varias poblaciones neuronales, incluyendo las neuronas de los ganglios espinales (Smeyne et al., 1993), las neuronas simpáticas (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995; Mesner et al., 1995; Messina et al., 1996) y las neuronas corticales (González-Martín et al., 1992). Por contra, Fra1 y Fra2 -miembros de la familia Fos que funcionan como reguladores negativos- ven reprimida su expresión, mientras que ni *junB* ni *junD* modifican su patrón de expresión en relación con la privación

neurotrófica y la consiguiente muerte neuronal apoptótica (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995).

Tras la deprivación neurotrófica, el aumento de la expresión de *c-jun* es especialmente precoz, produciéndose pocas horas después y bastante antes de que pueda observarse ningún cambio morfológico (Estus et al., 1994). Se produce independientemente de la síntesis macromolecular, por lo que se ha sugerido que probablemente depende de mecanismos posttranscripcionales (Estus et al., 1994). Sin embargo, la expresión de *c-fos* está limitada a aquellas neuronas que experimentan la condensación de su cromatina, y precisa la síntesis de proteínas (Estus et al., 1994), por lo que es probable que forme parte del programa de muerte activado en las neuronas apoptóticas. La implicación de la actividad AP-1 en los mecanismos de la apoptosis queda demostrada al comprobarse cómo el bloqueo funcional de c-Jun o de los diferentes miembros de la familia Fos (c-Fos, FosB, Fra1 y Fra2) mediante la microinyección de anticuerpos, protege las neuronas deprivadas de estimulación neurotrófica de la muerte apoptótica (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995).

Asimismo, la sobreexpresión de c-Jun es *per se* suficiente para inducir la muerte apoptótica de neuronas simpáticas en cultivo (Ham et al., 1995). Curiosamente, la inducción de la transcripción de *c-jun* (Devary et al., 1991; Manome et al., 1993) y *c-fos* (Crawford et al., 1988; Shibanuma et al., 1988) también ha sido documentada en otros modelos de muerte celular apoptótica.

Aunque la implicación de c-Jun y c-Fos en la apoptosis neuronal parece clara, se desconoce a través de qué mecanismos actúan. Dado que también es posible detectar la inducción de estos genes de expresión precoz en múltiples situaciones “tróficas”, parece obvio que el incremento

de la expresión de dichos genes no es suficiente para provocar la muerte celular. En las neuronas, el aumento de la expresión de los genes *c-jun* y *c-fos* en relación con la privación neurotrófica parece depender de la activación de la familia de kinasas JNK (Estus et al., 1994). Estas kinasas, emparentadas con las MAPK's y con capacidad para fosforilar el dominio de transactivación de c-Jun y, secundariamente, regular la expresión y actividad de AP-1 (Hibi et al., 1993; Dérijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1994), pueden activarse en relación con una gran variedad de estímulos inductores de muerte celular (Davis, 1994). La disminución de la expresión de Fra1 y Fra2 observada durante la apoptosis neuronal (Estus et al., 1994) es uno de los puntos de divergencia entre el ciclo celular y la apoptosis, ya que durante la reentrada en el ciclo celular, tras la inducción de c-Jun y c-Fos se produce un incremento de la expresión de Fra1 y Fra2 (Cohen y Curran, 1988). Por último, ni JunB ni JunD parecen estar implicados en los mecanismos de la apoptosis neuronal (Estus et al., 1994).

6.5.6 *Reguladores del ciclo celular*

La apoptosis y la mitosis podrían estar íntimamente relacionadas o incluso acopladas (Ucker, 1991; Janeway y Golstein, 1993; Rubin et al., 1993). A favor de esta conexión está la participación en el control de la apoptosis de genes conocidos por intervenir en la regulación de la proliferación celular, como *c-myc*, p53, las ciclinas y las proteínas kinasas dependientes de ciclina (Cdk's), la proteína del retinoblastoma (pRb) o el factor E2F.

6.5.6.1 *c-myc*

El proto-oncogén *c-myc* está implicado en la transformación celular y la mitogénesis, pero paradójicamente también es un potente inductor de

la muerte celular programada o apoptosis en diversos tipos celulares (Askew et al., 1991; Bissonnette et al., 1992; Evan et al., 1992; Shi et al., 1992). No obstante, el efecto de *c-myc* parece depender del tipo celular, no siendo preciso en todas las formas de apoptosis (Vaux y Weissman, 1993). Aunque se desconoce el mecanismo por el que *c-myc* induce la apoptosis, se han descrito interacciones entre este factor transcripcional y miembros de la familia Bcl-2 (Vaux et al., 1988; Blackwood y Eisenman, 1991; Bissonnette et al., 1992; Fanidi et al., 1992; Ayer et al., 1993; Zervos et al., 1993; Hoang et al., 1994).

6.5.6.2 p53

Otro importante gen que pertenece a este grupo es el gen supresor de tumores, *p53* (Yonish-Rouach et al., 1991; Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993a). El gen *p53* codifica un activador transcripcional que interviene en la regulación de la estabilidad genómica, la respuesta celular al daño en el ADN y la progresión del ciclo celular, de forma que *p53* detiene las células en la fase G_1 para permitir la reparación del ADN antes de iniciarse su replicación (revisado por: Oren, 1994). Recientemente se ha demostrado que la expresión de este gen supresor de tumores se relaciona con la inducción de la muerte apoptótica en diferentes tipos celulares (Yonish-Rouach et al., 1991; Colombel et al., 1992; Hengartner et al., 1992; Shaw et al., 1992; Allsopp et al., 1993; Clarke et al., 1993; Debbas y White, 1993; Lotem y Sachs, 1993; Lowe et al., 1993a, 1993b; Ryan et al., 1993; Gottlieb et al., 1994; Merlo et al., 1995; Eizenberg et al., 1995, 1996).

En el caso concreto de las neuronas, la inducción de *p53* se relaciona con algunas formas de muerte neuronal (Sakhi et al., 1994; Wood y Youle, 1995; Eizenberg et al., 1996; Xiang et al., 1996; Jordan et

al., 1997), aunque no parece ser un determinante importante en el fenómeno de muerte neuronal fisiológica. Animales transgénicos que carecen de p53 funcional no parecen presentar alteraciones en el desarrollo embrionario del SN (Donehower et al., 1992; Davies y Rosenthal, 1994; Wood y Youle, 1995). Tampoco se ha observado ningún aumento de la expresión de p53 en el paradigma de la muerte neuronal inducida por privación neurotrófica (Davies y Rosenthal, 1994; Freeman et al., 1994).

Se desconoce cuál es el mecanismo preciso por el que p53 participa en la regulación de la muerte celular apoptótica. Se supone que cuando el daño del ADN no puede ser reparado, p53 desencadena la muerte apoptótica (Chang et al., 1993). La proteína p53 estimula la expresión de las familias génicas *gadd* (*growth arrest and DNA damage-inducible genes*) y *MyD* (*myeloid differentiation genes*), que codifican una serie de proteínas potencialmente implicadas en el proceso apoptótico (Selvakumaran et al., 1994a; Zhan et al., 1994). La función de la proteína p53 podría estar regulada a través de kinasas y fosfatasa, algunas de ellas implicadas en las vías de transducción de las NT's (Milne et al., 1994; Takenaka et al., 1995).

Por otra parte, p53 podría ejercer su acción proapoptótica decantando la relación entre Bcl-2 y Bax a favor de este último, aumentando así el grado de susceptibilidad de las células a la muerte apoptótica. La actividad de p53 se correlaciona con una reducción de la expresión de Bcl-2 (Haldar et al., 1994; Miyashita et al., 1994a) y un incremento de la expresión y actividad de Bax (Miyashita et al., 1994b; Selvakumaran et al., 1994b; Miyashita y Reed, 1995; Yin et al., 1997). En contrapartida, las proteínas Bcl-2 y E1B 19 kDa pueden bloquear la apoptosis p53-dependiente (White, 1993; Chiou et al., 1994; Wang et al., 1995c). También se ha descrito la existencia de interacciones

complementarias entre la activación de *p53* y la supresión de *c-myc* en el control de la detención del ciclo celular y la apoptosis (Levy et al., 1993; Hermeking y Eick, 1994).

6.5.6.3 Las ciclinas y las proteína kinasas dependientes de ciclinas

El inicio y la progresión de las diferentes fases sucesivas del ciclo celular están dirigidos por dos familias de proteínas, las ciclinas y las Cdk's (revisado por: Sherr, 1993; Hunter y Pines, 1994). Las ciclinas funcionan como subunidades reguladoras de las Cdk's. A su vez, la familia de Cdk's está integrada, entre otras, por la Cdk1 (más conocida como Cdc2), la Cdk2, la Cdk3, la Cdk4, la Cdk5 y la Cdk6. La proteína kinasa Cdc2 y las ciclinas A y B están implicadas en el inicio de la mitosis. Por otra parte, las Cdk2 y Cdk3 junto con las ciclinas C, D y E son necesarias para la progresión a través de las fases G₁ y S del ciclo celular. Por último, Cdk4, Cdk5 y la Cdk6 pueden formar complejos con las ciclinas D durante la fase G₁ del ciclo celular.

En los últimos años se ha demostrado la participación de estos reguladores en una serie de diferentes modelos de apoptosis no neuronal (Meikrantz et al., 1994; Shi et al., 1994; Li et al., 1995a; Han et al., 1996). Resulta de interés que las neuronas postmitóticas expresan un gran número de los citados reguladores del ciclo celular (ciclina B, ciclina C, ciclina D1, ciclina D3, ciclina E, Cdk4 y Cdk5) (Hellmich et al., 1992; Freeman et al., 1994). Los factores neurotróficos, al estimular y mantener la diferenciación neuronal, inducen una disminución de la expresión de la mayoría de dichos reguladores (Hayes et al., 1991; Okano et al., 1993; Freeman et al., 1994; Yan y Ziff, 1995).

Algunos de estos reguladores del ciclo celular aparentemente participan en la muerte neuronal apoptótica por privación neurotrófica. En las células PC12 diferenciadas neuronalmente se observa la

activación de Cdc2 (Brooks et al., 1993) y de la ciclina B (Gao y Zelenka, 1995) tras la deprivación neurotrófica, mientras que el tratamiento con NGF comporta una reducción de la actividad de Cdk2 y Cdc2 (Buchkovich y Ziff, 1994; Dobashi et al., 1995). La activación prematura de Cdc2 y/o de las ciclinas A y B en un momento inapropiado del ciclo celular también ha sido implicada en la apoptosis de células de estirpe linfóide (Rubin et al., 1993; Hoang et al., 1994; Meikrantz et al., 1994; Shi et al., 1994; Fotedar et al., 1995). De hecho, se ha relacionado la activación de Cdc2 con la inducción de la muerte apoptótica por *c-myc* y p53 (Bissonnette et al., 1992; Evan et al., 1992; Yonish-Rouach et al., 1991).

Por otra parte, Bcl-2 parece antagonizar la capacidad de Cdc2 para inducir la apoptosis (Meikrantz et al., 1994). La activación de Cdc2 podría actuar como punto de convergencia de los diferentes estímulos apoptóticos, formando parte del mecanismo por el que las células apoptóticas inician la disrupción del núcleo. En el inicio del ciclo celular, a través de la formación de un complejo con las ciclinas A y/o B, Cdc2 controla la disolución de la membrana nuclear y favorece la condensación cromatínica (Shi et al., 1994). Sin embargo, la posible implicación de Cdc2 en la muerte neuronal apoptótica ha sido cuestionada recientemente tras comprobarse que las neuronas, al menos las simpáticas, no expresan niveles detectables de transcritos de Cdc2 tras la deprivación neurotrófica (Freeman et al., 1994). De hecho, en condiciones normales las neuronas simpáticas no expresan niveles significativos de Cdc2, Cdk2 o ciclina A (Freeman et al., 1994) al haber cesado su expresión con la diferenciación de las células neuronales durante el desarrollo embrionario del SN (Hayes et al., 1991; Okano et al., 1993).

La ciclina D1 es otro de los reguladores de las Cdk's que está implicado en el control de la progresión a través de la fase G₁ en el ciclo celular (Baldin et al., 1993; Quelle et al., 1993), cuya participación ha sido demostrada también en la muerte apoptótica de las neuronas (Freeman

et al., 1994; Herrup y Busser, 1995; Kranenburg et al., 1996). Tras la privación neurotrófica, en las neuronas apoptóticas es posible detectar un aumento considerable de los niveles de ARNm para ciclina D1 (Freeman et al., 1994; Herrup y Busser, 1995) así como de la actividad de Cdk4, una kinasa dependiente de la ciclina D1 (Kranenburg et al., 1996), que aparentemente va precedido de la expresión de *c-jun* (Herber et al., 1994). No obstante, la transcripción de Cdk4, así como de Cdk5 y de las ciclinas D3 y E, disminuye significativamente a medida que las neuronas mueren apoptóticamente. De acuerdo con estas observaciones, la sobreexpresión de ciclina D1 es suficiente para inducir la muerte apoptótica, tanto de células neuronales como no neuronales, pudiendo ser contrarrestada por las proteínas Bcl-2 y E1B 19K (Kranenburg et al., 1996).

Recientemente se ha tipificado un nuevo grupo de proteínas caracterizadas por su capacidad de interaccionar con los complejos ciclina-Cdk y de inhibir su actividad (revisado por: Peter y Herskowitz, 1994). En concreto, p21^{waf} es capaz de inhibir la actividad kinasa de Cdc2, Cdk2 y Cdk4 (El-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Noda et al., 1994). Los estudios realizados sobre los mecanismos de acción de p21^{waf} han proporcionado evidencias adicionales de la implicación de las ciclinas y las Cdk's en los procesos de la muerte neuronal apoptótica. En concreto, p21^{waf} confiere, tanto a células neuronales (Park et al., 1996b; Poluha et al., 1996) como no neuronales (Wang y Walsh, 1996), resistencia contra la muerte apoptótica. Su actividad puede ser inducida por mecanismos dependientes de p53 (Harper et al., 1993; El-Deiry et al., 1993, 1994; Dulic et al., 1994).

Aunque las evidencias a favor de la implicación de las ciclinas y las Cdk's en la apoptosis neuronal van en aumento, aún no se comprenden bien los mecanismos a través de los cuáles actúan y se integran con el resto de mediadores moleculares de la apoptosis. En cualquier caso, está

claro que estos reguladores no son suficientes *per se* para mediar la apoptosis. De hecho, durante la diferenciación de las células PC12 en respuesta a su estimulación con NGF, es posible detectar una importante inducción de la expresión de ciclina D1 (Dobashi et al., 1995; Yan y Ziff, 1995) así como del inhibidor de las Cdk's p21waf (Yan y Ziff, 1995).

6.5.6.4 La proteína del retinoblastoma

Un importante sustrato de las Cdk's -en especial de las Cdk's dependientes de la ciclina D- es el producto del gen de retinoblastoma, conocido como pRb (Ewen et al., 1993; Kato et al., 1993). Cuando está hipofosforilada, pRb se activa y detiene el ciclo celular en el inicio de la fase S en virtud de su capacidad para inhibir la actividad de los miembros de la familia E2F de factores transcripcionales (Nevins, 1992). Por contra, en fases tardías de G₁ las Cdk's fosforilan pRb, perdiendo así su efecto inhibitor del avance del ciclo celular (revisado por: Sherr, 1994).

La proteína pRb también ha sido relacionada con el fenómeno de la muerte neuronal apoptótica. Durante la apoptosis neuronal se produce la activación del complejo ciclina D1-Cdk4, conocido por su capacidad de fosforilar e inactivar pRb (Kranenburg et al., 1996). Asimismo, se reducen los niveles de pRb en las neuronas moribundas (Freeman et al., 1994). De acuerdo con estas observaciones, en ratones que no expresan la proteína Rb, se potencia el fenómeno de muerte neuronal durante el desarrollo embrionario, tanto en el SNC como en el SNP (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992b, 1994a; Slack et al., 1995). Por otra parte, pRb es capaz de inhibir la apoptosis neuronal inducida por la ciclina D1 (Kranenburg et al., 1996). La proteína pRb también ha sido implicada en varios modelos de apoptosis no neuronal (Dyson et al., 1989; Clarke et al., 1992; Morgenbesser et al., 1994; Wu y Levine, 1994; Haas-Kogan et al., 1995).

El mecanismo por el que pRb protege a las células de la muerte apoptótica no está claro. Se ha sugerido una conexión entre p53 y pRb en la regulación de la apoptosis, de forma que p53 se activaría en respuesta a la inactivación de pRb (Debbas y White, 1993; Lowe et al., 1993b; Caelles et al., 1994; Chiou et al., 1994; White, 1994; Haupt et al., 1995). No obstante, la expresión de p53 no parece ser necesaria para que pRb ejerza su acción antiapoptótica (Morgenbesser et al., 1994; Pan y Griep, 1994). Por otra parte, la forma hipofosforilada de pRb es capaz de interaccionar con la ciclina D1 (Dowdy et al., 1993), por lo que se ha hipotetizado que estas dos proteínas funcionan como antagonistas (Hinds et al., 1992; Dowdy et al., 1993). De hecho, en las neuronas simpáticas privadas de factor neurotrófico la expresión de pRb disminuye mientras que la de la ciclina D1 aumenta a medida que progresa la muerte celular (Freeman et al., 1994).

6.5.6.5 El factor transcripcional E2F

El factor transcripcional E2F es otro de los reguladores del ciclo celular aparentemente implicado en los mecanismos de muerte apoptótica. Este factor tiene una función esencial en el control del ciclo celular al participar en la regulación de la transición G₁-S. Su sobreexpresión es suficiente para inducir la apoptosis en diversos tipos celulares de estirpe no neuronal (Qin et al., 1994; Shan y Lee, 1994; Wu y Levine, 1994; Kowalik et al., 1995). Evidencias recientes apuntan a la existencia de una íntima relación a nivel funcional entre el factor transcripcional E2F y pRb (revisado por: Nevins, 1992; Hollingsworth et al., 1993). La activación del factor E2F se asocia con la fosforilación y, por tanto, la inactivación de pRb (Shan et al., 1996), presumiblemente a través de la activación de Cdk's (DeGregori et al., 1995; Shan et al., 1996). Por contra, el factor E2F puede ser inhibido a través de la formación de un complejo con la forma hipofosforilada de pRb (Bagchi et al., 1991; Bandara y La Thangue, 1991; Hiebert et al., 1992; Nevins,

1992; Hollingsworth et al., 1993; Riley et al., 1994). De hecho, recientemente se ha sugerido que E2F podría mediar la interrelación entre p53 y pRb. Al secuestrar pRb el factor transcripcional E2F, se produciría una acumulación de p53 que a su vez desencadenaría la muerte celular apoptótica (Hiebert et al., 1995).

6.5.7 Otros genes aparentemente implicados en la apoptosis

En sistemas no neuronales, se han identificado una diversidad de genes cuya expresión se correlaciona con la muerte celular apoptótica. Entre estos destacan los siguientes: el gen *TRPM-2* (*testosterone-repressed prostate message-2*) (Buttyan et al., 1989), la ubiquitina (Schwartz et al., 1990b), la glutatión S-transferasa (Briehl y Miesfeld, 1991), la hsp70 (Buttyan et al., 1988), las proteínas RP-2 y RP-8 (Owens et al., 1991) y el gen *nur77*, también conocido como NGFIB (Liu et al., 1994; Woronicz et al., 1994). Recientemente se ha clonado una isoforma de Grb2, denominada Grb3-3, con propiedades apoptóticas (Fath et al., 1994). Sin embargo, la mayoría de estos genes no son inducidos durante la muerte neuronal apoptótica por privación neurotrófica (Martin et al., 1992; Estus et al., 1994; Freeman et al., 1994).

Por otra parte, también se han descrito una serie de productos génicos con capacidad para inhibir la muerte celular apoptótica. Tal es el caso de la proteína DAD1, de identidad desconocida (Nakashima et al., 1993), de la proteína codificada por el gen *p35* de baculovirus (Clem y Miller, 1993, 1994; Sugimoto et al., 1994) o de la familia oncogénica *abl* (McGahon et al., 1994). En general se desconoce la posible implicación de estos genes en la regulación de la apoptosis neuronal. No obstante, recientemente se ha caracterizado el gen *NAIP* (de proteína inhibidora de la apoptosis neuronal; *neuronal apoptosis inhibitory protein*), cuya delección está aparentemente relacionada con la degeneración de las

MTN's espinales característica de las atrofas musculares espinales del tipo Werdnig-Hoffman o Kugelberg-Welander (Roy et al., 1995). Este gen codifica una proteína con un grado de homología significativo con la proteína p35 del baculovirus, conocida por su capacidad de inhibir la muerte apoptótica de células de insecto (Clem y Miller, 1993, 1994; Sugimoto et al., 1994).